MASTERAT - CERCETĂRI CRIMINALISTICE APLICATE

Chimie și toxicologie judiciară
Separatologie judiciară

Droghițoiu George
Mangalagiu Ion



AIT Laboratories S.R.L.

978-606-8363-09-7x2
2011

Elemente de
Toxicologie Medico-Legală

Motivație

In ultimii ani s-a observat o creştere enormă a interesului public pentru metodele şi disciplinele criminalistice stimulat mai ales de rezolvarea unor cazuri penale spectaculoase. Publicul consideră în general că medicii legişti sunt în fruntea luptei împotriva urgiilor lumii moderne, cum ar fi terorismul internațional şi traficul de droguri. Această lucrare de toxicologie medico-legală sau judiciară este consacrată, în principal analizei celor mai importante clase de droguri si otrăvuri.

Prin urmare, aici sunt tratate probleme reale şi relativ recente ale toxicologiei medico-legale, cum ar fi analiza markerilor pentru alcool, toxicologia remediilor din plante şi farmacogenomica aplicată în toxicologia medico-legală. Nu au fost uitate domeniile de interes mai puțin recente, cum ar fi conducerea automobilelor şi medicamentele, analiza unor substanțe neconvenționale, analiza cazurilor de dopaj şi asigurarea calității în analiza toxicologică. Un accent deosebit a fost pus pe screening-ul toxicologic.

Scopul acestei lucrări este, de aceea, de a prezenta critic informațiile la zi referitoare la metodele de separare şi analiză aplicate în diferite discipline ale ştiinței criminalistice. O carte nu poate şi nu ar trebui să înlocuiască lucrările ştiințifice, în ceea ce priveşte profunzimea şi clarificarea unei probleme specifice. Această carte a fost scrisă nu numai pentru criminalişti, ci şi pentru publicul larg interesat de problemele medico-legale şi, de asemenea, pentru alți colegi interesați, în special de aspectele de analiză a unor substanțe sau materiale toxice sau cu caracter de drog. Lucrarea ar trebui, totuşi, să prezinte problemele toxicologice relevante, în evoluția lor, importanța potențială a domeniului şi perspectivele de viitor.

Studenții de la cursurile de masterat în criminalistică vor aprecia probabil această introducere în domeniul toxicologiei criminalistice şi vor folosi lucrarea drept trambulină pentru realizarea unor cercetări de masterat şi, în coninuare de doctorat.

Structura generală a acestui volum corespunde celor mai importante discipline criminalistice care aplică diferite metode de separare, şi anume, toxicologia, chimia şi serohematologia judiciară. Capitolele dedicate toxicologiei medico-legale sunt axate pe anumite clase de droguri ilicite şi terapeutice şi pe alte substanțe de interes criminalistic. De asemenea, unele probleme specifice toxicologiei medico-legale, cum ar fi medicamentele şi conducerea autovehicolelor, controlul antidoping, asigurarea calității în analiza criminalistică, separările chirale şi strategia generală de analiză sunt discutate separat. În partea consacrată chimiei medico-legale, cele mai importante probleme sunt analiza explozivilor şi a acceleratorilor de incendiu.

Procedurile analitice de screening sunt printre strategiile de bază ale toxicologiei criminalistice şi sunt prezentate în detaliu în lucrare şi se referă la cele mai importante metode cromatografice, cum ar fi GC, GC-MS, HPLC, LC-MS, CE şi LC-ICPMS. În plus, în fiecare capitol sunt tratate anumite clase de droguri, iar metodele preliminare (în principal imunoteste) sunt prezentate împreună cu metodele separare. In practica medico-legală, este imposibil să se separe metodele preliminare cum ar fi imunotestele de cele foarte sigure şi confirmative cum sunt tehnicile cromatografice.

Iaşi, 2011

Dr. Gabi Drochioiu,
Facultatea de Chimie,
Universitatea Al. I. Cuza Iaşi

Cuprins

Studii de caz. Teste de culoare. Tehnici de microdifuziune.

Probleme speciale

Metodologia de lucru în toxicologia judiciară. Principalii compuşi investigați: alcoolul, otrăvurile şi drogurile.

Mărturia toxicologului în instanța de judecată.

Analiza drogurilor şi amestecurilor complexe de droguri prin GC-MS.

Analiza contaminanților prin tehnici de spectrofluorescență. Identificarea surselor cu potențial toxic.

Studiul metaboliților din sisteme biologice.

Probleme teoretice speciale în toxicologia judiciară

Concluziile cursului

Bibliografie generala

Abrevieri

6-AM	6-Acetilmorfină
ACN	Acetonitril
APCI	Ionizare la presiune atmosferică (Atmospheric pressure chemical ionization)
CE	Electroforeză capilară
CE-MS	Electroforeză capilară- spectrometrie de masă
CI	Ionizare chimică
CID	Disociere indusă de coliziune (Collision-induced dissociation)
CSF	Fluid cerebrospinal
DAM	Diacetilmorfine
DEA	Dietilamină
DHC	Dihidrocodeine
DMOA	Dimetiloctilamină
EMIT	Enzyme multiplied immunoassay technique
EIA	Enzim-imunodeterminare
ESI	Ionizare cu electropulverizare (Electrospray ionization)
FAB	Fast atom bombardment
FID	Flame ionization detector
FPIA	Fluorescence polarization immunoassay
FITC	Fluorescein isotiocianat
GC	Gas cromatografie
HPLC	Cromatografie de lichid de înaltă performanță (High-performance liquid

	(chromatography)
IDS	International Diagnostic Systems Corporation
LC–MS	Lichid cromatografie cuplată cu mas spectrometrie
LOD	Limită de detecție
LOQ	Limită cuantificare
LSD	Dietilamida acidullui lisergic
M6G	Morfin-6-glucuronida
MDMA	3,4-Metilenedioximetamfetamină
MEKC	Cromatografie capilară prin electrocinetică micelară
MeOH	Metanol
PTFE	Politetrafluoroetilenă
POD	Peroxidază
RIA	Radioimunodeterminare (Radioimmunoassay)
RP	Fază inversă (Reversed phase)
SFE	Supercritical fluid extraction
SPE	Extracție în fază solidă
SPME	Microextracție în fază solidă
TEA	Trietilenamină
TFA	Acid trifluoroacetic
TLC	Cromatografie în strat subțire (Thin-layer chromatography)
TMCS	Trimetilclorosilan
TMS	Trimetilsilil
TSP	Ionizare prin termospray
QTOF	Quadrupole-time-of flight

TOXICOLOGIA MEDICO-LEGALĂ SAU JUDICIARĂ

(Forensic Toxicology)

Cap. I. Introducere în toxicologia judiciară. Prezentarea domeniului. Istoria toxicologiei judiciare. Investigarea decesului de către toxicologi. Probele de analiză.

Cuprinsul capitolului:

1. Introducere
2. Istoria toxicologiei medico-legale
3. Decesele investigate de toxicologi
4. Analiza toxicologică
5. Laboratoarele de medicină legală
6. Interpretarea rezultatelor
7. Toxicologul ca martor expert
8. Intrebări şi probleme
9. Bibliografie şi note

1. Introducere în toxicologia judiciară

Toxicologia medico-legală sau judiciară are drept obiect de activitate punerea în evidență a toxicilor şi metaboliților lor în organe, lichide biologice, corpuri delicte. Toxicologul analizează fluidele biologice şi țesuturile victimelor presupuse a fi fost otrăvite accidental sau intenționat. Acesta are rolul de a dovedi crimele prin otrăvire, stabilirea sinuciderilor şi, mai recent, urmăreşte activitatea laboratoarelor clandestine de sinteză a unor droguri. Toxicologia medico-legală reprezintă aplicarea toxicologiei şi a unor ştiințe înrudite, cum ar fi chimia analitică, farmacologia şi chimia medicală la investigarea decesului, otrăvirii accidentale sau intenționate sau la depistarea drogurilor. Importantă este investigația toxicologică, utilizarea metodelor şi tehnicilor de lucru pentru obținerea şi interpretarea rezultatelor şi, mai puțin, aspectul legal. Toxicologul judiciar este interesat de studiul urmelor de la scena unei crime, dovezile fizico-chimice, existența pulberilor, a urmelor şi a oricărei substanțe chimice. Acesta determină ce substanțe chimice sunt prezente, în ce concentrație şi care este efectul probabil asupra unei persoane. Deoarece determinarea unei substanțe ingerate este complicată de procesele de metabolizare şi diluare în corp, este necesar să se studieze metabolizarea substanțelor toxice în corp. Astfel, în cadrul cercetărilor criminalistice (mai precis de toxicologie medico-legală) se prelevează şi se analizează probe de urină, sânge, păr, fluide orale, etc.

Recent, toxicologia ca ştiinţă a căpătat amploare, incluzând o gamă largă de direcţii de lucru, inclusiv evaluarea implicaţiilor şi riscurilor utilizării produselor farmaceutice, a pesticidelor şi a aditivilor alimentari, precum şi studii de otrăvire profesională, expunerea la poluarea mediului, efectele radiaţiei, şi în mod regretabil, războiul biologic şi chimic. Cu toate acestea, toxicologul criminalist este cel care a deţinut titlul de toxicolog pentru cea mai lungă perioadă de timp. Toxicologul criminalist este preocupat, în primul rând, de detectarea şi cuantificarea otrăvurilor în ţesuturile şi fluidele organismului obţinute la autopsie sau ocazional, în sânge, urină sau conţinut gastric, obţinute de la o persoană vie. Odată ce analiza este completă, toxicologul criminalist interpretează rezultatele din punct de vedere fiziologic şi / sau al efectelor comportamentale ale otrăvii asupra persoanei de la care s-a prelevat proba. În cazul ţesuturilor colectate la autopsie, rezultatele analitice pot dezvălui faptul că victima a murit prin otrăvire. În organismele vii, prezenţa unui medicament sau drog într-o probă de sânge sau urină poate explica coma, convulsiile sau un comportament neobişnuit.

Lucrarea de faţă îşi propune să aducă în faţa cititorilor cele mai importante descoperiri în domeniul amintit, să prezinte modul de folosire a tehnicilor de lucru în criminalistică şi sădescrie modul de folosire a rezultatelor în instanţa de judecată. Sunt descrise pe larg majoritatea metodele utilizate, cu referire deosebită asupra celor utilizate la depistarea şi determinarea cantitativă a drogurilor, alcoolului, otrăvurilor, medicamentelor toxice în doze mari. Totuşi, din gama destul de vastă a metodelor fizico-chimice pe care criminalistica le are la îndemână, în cadrul lucrării vor fi menţionate doar aspectele relevante, incluzând şi exemple de aplicaţii privind exploatarea metodelor moderne de analiză GC-MS şi FT-IR. Se dau informaţii asupra modalităţilor actuale folosite în asigurarea controlului şi calităţii măsurătorilor toxicologice cu aplicaţii în criminalistică.

Progresele tehnologiei ştiinţifice utilizate de către laboratoarele criminalistice moderne şi a criminalităţii necesită cunoştinţe în domeniile ştiinţei naturale, de biologie, chimie, fizică şi matematică. Aceste laboratoare, de obicei, necesită o diplomă în una sau mai multe dintre aceste domenii pentru angajare la nivelul de bază. Multe persoane cu masterat şi doctorat de sunt serologi, toxicologi şi utilizatori de microscop. A crescut numărul colegiilor şi universităţilor care acordă diplome universitare şi postuniversitare în domeniul ştiinţei criminalistice, inclusiv a toxicologiei medico-legale. Criminalistul din laborator are o carieră interesantă, plină de realizări şi acesta poate fi un absolvent de facultate care s-a specializat în una sau mai multe dintre ştiinţele naturale.

2. Prezentarea domeniului. Dozele toxice şi stabilirea nocivităţii

Toxicologia judiciară se ocupă cu detectarea substanţelor toxice şi a drogurilor în ţesuturile şi fluidele corpului. Toxicologul analizează fluidele biologice şi ţesuturile victimelor care se presupune că au fost otrăvite accidental sau intenţionat.

Cunoaşterea proprietăţilor otrăvurilor este necesară pentru a înţelege mecanismele de acţiune toxică care conduc la leziuni biochimice sau la alterări histologice şi pentru stabilirea metodologiei de analiză. De asemenea, izolarea, identificarea şi dozarea toxicilor sunt necesare atât pentru scopuri criminalistice, în caz de deces, dar şi pentru supravegherea mediului (aer, apă, alimente), cât şi pentru stabilirea circuitului toxicilor în organism.

Combaterea simptomelor de otrăvire presupune tratarea lor, precum şi elaborarea de măsuri profilactice şi stabilirea concentrațiilor maxime admisibile. Otrăvurile pot fi produse şi de plante (alcaloizi, glicozizi), de animale (ptomaine, veninuri), de mucegaiuri (micotoxine), etc.

Toxicologul, spre deosebire de chimistul criminalist, se ocupă în primul rând de materialele biologice şi poate detecta otrăvuri în sânge, urina, lichidul cefalorahidian, conținutului gastric, bilă, şi țesuturi.

În trecut, omul a cunoscut intuitiv sau prin observație proprietățile toxice ale unor substanțe de origine minerală, vegetală sau animală. Aceste cunoştințe au fost aplicate mai târziu, după ce omul a început să ucidă animale, la fabricarea săgeților otrăvite (curara). Totodată, omul a utilizat antidoturi împotriva otrăvurilor de origine vegetală şi animală (veninuri).

2.1 Noțiunea de otravă

Noțiunea de *toxic* derivă din grecescul "toxikon" (otravă), care, după Dioscoride (sec. I d. H.) derivă de la "toxon"(arc) şi se referă la săgețile otrăvite. Se mai afirmă că "toxikon" provine de la egipteanul "tako" (distrugere, moarte). După Pliniu (sec. I d.H.), termenul "toxicus" derivă de la "taxus", o specie de conifer ale cărui fructe erau folosite la înveninarea săgeților şi despre care se ştie astăzi că îşi datoresc toxicitatea alcaloidului taxină. Cuvântul "otravă" provine de la verbul slav "otraviti" (a mâhni, a tulbura sănătatea sufletească). Termenul de otravă se referă numai la toxicul folosit în scop criminal. De asemenea, există noțiunea de venin, derivat de la "venenum" (otravă); în accepțiunea modernă, prin venin se înțelege curent toxina elaborată de unele specii de animale. Noțiunea de "toxină" se referă la substanțele organice produse de organismele animale sau vegetale, capabile să genereze intoxicații. În cadrul toxicologiei intră numai micotoxinele, nu şi toxinele bacteriene şi helmintice.

Prin "toxic", Galenus (sec. II d.H.) înțelegea "orice lucru care poate altera organismul nostru". În sec. VIII Jabir ibn Hayyan (Geber) ar fi arătat că otrăvurile îşi manifestă acțiunea nu numai prin natura lor, ci şi prin "locul şi timpul utilizării, forma otrăvii, caracteristicile individuale ale omului". Paracelsus (1493-1541) introduce noțiunea de doză. Orice substanță care, atunci când este luată în cantitate suficientă, cauzează probleme de sănătate sau moartea poate fi considerată otravă. Expresia cheie în această definiție este "cantitate suficientă". Paracelsus a observat încă în sec. al 16-lea că "Toate substanțele sunt otrăvuri; nu este nici una care să nu fie o otravă. Doza potrivită face diferența dintre o otravă şi un remediu." Cantități mici de arsenic, cianură şi alte otrăvuri pot fi ingerate fără a manifesta toxicitate aparentă.

In edictul dat de Ludovic al XIV-lea în 1682, referitor la "afacerea otrăvurilor", se arăta că: "Tot ceea ce provoacă o moarte rapidă sau afectează un timp sănătatea omului, indiferent dacă este vorba de un corp simplu sau compus, trebuie privit ca o otravă adevărată".

După Ogier (1853-1913), toxicul sau otrava este "orice substanță a cărei prezență în organism nu este nici normală, nici obişnuită". Fabre şi Truhaut consideră că " toxic este substanța care, după pătrunderea în organism în doză relativ ridicată (unică sau repetată la

intervale scurte) sau în doze mici (repetate timp îndelungat) determină, imediat sau după o perioadă de latență, în mod trecător sau persistent, alterarea uneia sau mai multor funcții ale organismului, putând duce la moarte".

O concepție asemănătoare întâlnim şi unii autori arabi: "Tot ceea ce se absoarbe – scrie Al-Biruni (973-1048) în *Cartea drogurilor* – se împarte în alimente şi otrăvuri, iar între cele două categorii se situează medicamentele … ele sunt vătămătoare în comparație cu alimentele şi curative în comparație cu otrăvurile, iar acțiunea lor curativă se manifestă numai atunci când sunt utilizate de un medic priceput şi scrupulos. De aceea, între ele şi alimente există aşa-numitele alimente medicamentoase, iar între ele şi otrăvuri, aşa-numitele medicamente toxice". Relaţia medicament-otravă este definită succint de Gerolamo Mercuriali (1530-1606): "Otrava este un medicament mortal".

2.2 Grupe de otrăvuri

În investigarea unei otrăviri, este necesară mai întâi izolarea şi identificarea otrăvii de către toxicolog. Astfel, toxicologii criminalişti clasifică otrăvurile pe grupe, în funcție de metoda utilizată pentru a izola substanțele din țesuturile sau fluidele corpului.

Grupa I: Gaze. Majoritatea gazelor de importanță toxicologică nu sunt detectabile în probele prelevate pentru autopsie. Cu toate acestea, unele pot fi izolate din țesutul pulmonar sau din sânge prin procesele de aerare. De obicei, probe de aer sunt colectate de la locul faptei.

Grupa II: Vapori de otrăvuri volatile. Compuşii din această grupă sunt izolați prin distilare cu vapori. Proba (sânge, urină sau omogenatul tisular) se acidulează cu acid clorhidric sau se alcalinizează cu oxid de magneziu solid. Un flux de abur este trecut peste eşantion şi otrăvurile volatile sunt îndepărtate prin distilare într-un distilat apos. Otrăvurile distilabile dintr-un mediu acid includ tetraclorura de carbon, cloroform, etanol, cianuri, metanol, fenoli, nitrobenzeni şi fosfor galben. Otrăvurile distilabile dintr-un mediu alcalin includ amfetaminele, anilina, meperidina, metadona şi nicotina.

Grupa III: Otrăvuri metalice. Metalele sunt izolate din țesut prin distrugerea tuturor compuşilor organici conținuți în țesut. Țesutul poate fi distrus de căldura excesivă (incinerare uscată) sau prin fierbere cu acizi concentrați sau agenți oxidanți puternici (incinerare umedă). Pentru a identifica anumite otrăvuri metalice rămase în cenuşă pot fi folosite diverse metode.

Grupa IV: Otrăvuri organice nonvolatile. Acest grup conține cele mai multe dintre medicamentele de interes pentru toxicologi astăzi. Compuşii din această grupă sunt de obicei prezenți în țesuturi numai în cantități foarte mici. Unele medicamente (de exemplu, barbituricele) pot fi extrase direct din omogenatele tisulare, cu ajutorul solvenților organici. Cu toate acestea, mulți compuşi sunt adesea separați de cea mai mare parte a țesutului matrice, prin prepararea unui filtrat de țesut fără proteine. Acest filtrat este apoi supus la

extragerea selectivă cu solvenți organici, în diferite condiții de aciditate. Folosind aceste tehnici, drogurile sunt clasificate în cinci subgrupuri.

1. Acizi tari (de exemplu, clorotiazide, salicilați)
2. Acizilor slabi (de exemplu, acetaminofen, barbiturice)
3. Neutre (de exemplu, meprobamate, metaprylon)
4. Baze (de exemplu, codeină, fenotiazine, stricnină, chinină)
5. Amfoterice (de exemplu, hidromorfonă, morfină)

Grupa V: Otrăvuri diverse. Această grupă include toate otrăvurile neclasificate în ultimele patru grupe. Substanțele incluse în această grupă sunt anioni anorganici (de exemplu, brom), ioni organici foarte uşor solubili în apă (de exemplu, curara, fluoroacetat, paraquat) şi compuşi organici insolubili în apă sau alcool. În general, trebuie folosite tehnici specifice pentru izolarea şi identificarea acestor compuşi din probele biologice. În efectuarea unei analize, toxicologul are la dispoziție toate tehnicile moderne de chimie analitică. În cazul în care otrava care a provocat moartea este cunoscută, poate fi efectuată o anumită analiză; cu toate acestea, în cazul în care agentul nu este cunoscut, sau este suspectată prezența mai multor otrăvuri, toxicologul trebuie să efectueze mai întâi o serie de analize, pentru a determina care sunt substanțele toxice prezente şi apoi pentru a stabili prin analiză cantitativă, cantitatea din fiecare substanță toxică prezentă în diferite probe. Deşi numeroase metode chimice sunt disponibile toxicologului, doar o parte dintre procedurile cele mai comune sunt discutate. Toate aceste metode pot fi aplicate la analiza calitativă (identificarea) şi cantitativă (concentrație).

2.3 Otravă şi medicament

Multe dintre medicamentele utilizate în prezent au un potențial toxic. Asemănarea dintre toxic şi medicament a fost observată încă din antichitate. Grecii foloseau termenul de "pharmakon" cu sensul atât de medicament, cât şi de otravă. Explicația acestui comportament comun nu poate fi dată dacă ne menținem în granițele biologiei moleculare actuale. Într-o viziune structural-fenomenologică (Drăgănescu, 1990), ființele vii sunt considerate ca fenomene care se manifestă pe structuri materiale şi, de aceea, ele cuprind mai mult decât un singur nivel de organizare (structurare), cel molecular. Plantele manifestă un nivel de organizare biostructural care, împreună cu nivelul molecular coexistent, formează materia biosică (Macovschi, 1968, 1972). Nivelul de organizare biostructural confera plantelor şi viețuitoarelor în general însuşirea de viu. Animalele mai prezintă un altreilea nivel de structurare, cel psihostructural, suportul pe care se manifestă în lumea înconjurătoare emoțiile, sentimentele şi trăirile specifice animalelor dar şi omului (Papacostea, 1979). Omul este posesorul unui al patrulea nivel, caracteristic autoconştienței şi gândirii abstracte (Macovschi, 1979). Aceste nivuri se află într-o anumită armonie între ele într-un corp sănătos, indiferent dacă acesta este o plantă, un animal sau un om. Perturbarea echilibrului dintre nivelurile de structurare specifice lumii

înconjurătoare poate conduce la starea de boală, iar în cazul intoxicațiilor, perturbarea echilibrului dintre niveluri poate fi provocată de o substanță străină corpului. Alte substanțe permit reechilibrarea organismului viu. Atât medicamentele, cât şi toxicii sunt capabili să modifice acest echilibru. Deplasarea echilibrului, care se poate face într-un sens sau altul, poate determina vindecarea unei boli, o stare toxică sau chiar moartea organismului în cauză. Substanțele proprii corpului, în general, nu afectează acest echilibru, iar alimentele, în doze normale, sunt transformate în substanțe proprii fără efecte toxice.

2.4 Tipuri de otrăvuri. Intoxicații şi otrăviri

Otrăvurile pot fi de *origine* minerală, vegetală sau sintetică. După *constituție chimică* sunt toxici anorganici, organici etc., iar după *comportarea analitică* pot fi otrăvuri sau toxici gazoşi, volatili, minerali, organici nevolatili, acizi, baze, oxidanți etc.

Comportare fiziopatologică îi separă ca toxici cu acțiune asupra sistemului nervos central, sistemului nervos vegetativ, aparatului respirator, sistemului cardiovascular, sângelui şi organelor hematopoietice.

Otrăvurile au multiple proveniențe: toxici industriali, medicamente, plante toxice, pesticide, detergenți, materiale plastice, aditivi alimentari, toxine (zoo- şi fitotoxine), substanțe toxice de luptă etc.

Otrăvirea sau intoxicarea este un răspuns al organismului față de agresiunea toxică şi depinde, în primul rând, de o proprietate caracteristică a substanței – *toxicitatea*.

În raport cu *originea* factorilor care determină intoxicațiile, acestea se clasifică în:

Intoxicațile pot fi *endogene* (intoxicații alimentare) sau *exogene*, provocate de toxicii pătrunşi în organism pe diferite căi; acestea fac obiectul toxicologiei. În clasa intoxicațiilor exogene se disting:

– *Intoxicațiile intenționate* (voluntare): crime, sinucideri, toxicomanii;

– *Intoxicațiile accidentale*: accidentele propriu-zise, medicamentoase, profesionale, alimentare.

Crimele prin otrăvire, în continuă scădere, utilizează pesticide organofosforice, digitalice, taliu etc.

Sinuciderile prin otrăvire, în număr din ce în ce mai mare, se realizează prin medicamente (opiacee, psihotrope), apoi prin pesticide, monoxid de carbon, gaze naturale, alcaloizi, sodă caustică etc.

Toxicomania (gr. *toxicon* = otravă + *mania* = nebunie) este starea de intoxicație, periodică sau cronică, determinată de consumarea repetată a unui drog, natural sau sintetic. Caracteristicile sale sunt dorința de neînvins sau necesitatea de a continua consumarea drogului şi de a-l procura cu orice preț; tendința de a mări progresiv dozele, dependența de ordin psihic şi, în general, dependența fizică față de efectele drogului, cu apariția sindromului de abstinență la suprimarea lui, efecte nocive asupra individului, familiei şi societății.

Doparea nu este o intoxicație propriu-zisă, ci reprezintă întrebuințarea mijloacelor şi substanțelor naturale sau sintetice (în special psihoanaleptice) capabile să mărească performanțele, în vederea unei competiții fizice sau intelectuale. În mod obişnuit, senzația de

oboseală după un efort prelungit obligă subiectul să-şi întrerupă activitatea. Substanţele dopante înlătură în mod artificial senzaţia de oboseală şi, implicit, elimină semnalul de alarmă indicând nevoia de odihnă. Oboseala este însă numai mascată, necesitând administrarea unei noi doze de substanţă dopantă. Doparea aduce prejudicii eticii sportive, precum şi integrităţii fizice şi psihice a sportivilor.

Intoxicaţiile accidentale propriu-zise se datorează neatenţiei, neştiinţei sau imprudenţei şi sunt legate de păstrarea şi folosirea improprie a pesticidelor, medicamentelor, substanţelor chimice de uz casnic (sodă caustică, detergenţi, produse petroliere etc.), de defecţiuni de tiraj ale sobelor (gaze naturale, cărbune), de gazele de eşapament ale automobilelor (în garaje).

Intoxicaţiile medicamentoase au loc prin:

─ *Eroarea medicului,* prin prescrierea unor cantităţi de substanţă activă care depăşeşte dozele maxime terapeutice, a medicamentelor conţinând un principiu activ comun (efect cumulativ) sau sediu comun de acţiune (efect sinergic), a principiilor active care, prin asociere, conduc la efecte toxice sau la potenţare exagerată etc

─ *Eroarea farmacistului*, prin nedescifrarea corectă a reţetei, nesemnalării erorii din reţetă, confuzie de substanţe, eliberarea unui preparat neomogen etc.

─ *Eroarea bolnavului* prin supradozare, automedicaţie, polipragmazie, confuzie de medicament sau de cale de administrare etc

Intoxicaţiile profesionale au loc în industria chimică, extractivă, agricultură, ateliere meşteşugăreşti etc. Aceste intoxicaţii sunt produse de compuşii unor metale şi nemetale, pesticide, solvenţi organici, cancerigeni etc. Acest tip de intoxicaţii face obiectul criminalisticii numai în caz de deces.

În funcţie de *timpul instalării intoxicaţiei* se cunosc:

- *Intoxicaţia acută,* toxicul fiind absorbit în doză relativ mare şi unică sau în doze mai mici şi repetate la intervale scurte, iar manifestările toxice apar pe neaşteptate, sunt violente şi pot fi urmate de moarte. După timpul de apariţie şi violenţa manifestărilor toxice, se disting: intoxicaţia supraacută, acută şi subacută;

- *Intoxicaţia cronică* numită şi "intoxicaţia pe termen lung" reprezintă totalitatea efectelor toxice produse prin administrarea repetată a unui toxic în aceeaşi doză, pe o perioadă mai mare parte din viaţa omului. Leziunile biochimice şi morfofuncţionale apar lent, dar continuu. Intoxicaţia pe termen lung prin absorbţie repetată de doze mici are loc în cazul toxicilor cumulativi (metanol, digitalice, metale grele, fluor, derivaţi de arsen etc.) prin cumularea dozelor sau prin cumularea efectelor, în cazul substanţelor cancerigene.

Intoxicaţia pe termen lung poate fi cauzată de o doză unică. Toxicitatea în formă agravată se manifestă, de pildă şi la câteva săptămâni după ingerarea unei doze unice de Paraquat. La fel se comportă unele insecticide organofosforice cu acţiune neurotropă întârziată, nitrozaminele cancerigene etc.

Intoxicaţia acută reprezintă totalitatea efectelor toxice produse prin administrarea unui toxic într-o singură doză, putând provoca moartea a 50% din animalele dintr-un lot în decurs de 24-48 ore (sau până la 15 zile pentru toxicii cu efect întârziat).

Aprecierea toxicității acute pe bază de DL_{50} are dezavantajul că nu ține seama de masa moleculară, deoarece trebuie să se ia în considerare numărul de molecule implicate în mecanismele fiziopatologice. S-a introdus, de aceea, noțiunea de *potențial de toxicitate*, pT = log [T]. Valoarea T se calculează după valoarea DL_{50} i.p. la şoareci şi reprezintă concentrația molară toxică a substanței, exprimată în moli/kg.

Concentrația letală în atmosferă (CL) exprimă toxicitatea acută a substanțelor care pătrund pe cale respiratorie şi are aceeaşi semnificație ca şi DL. Exprimarea sa se face astfel:

─ masa/volum (g/v);

─ volum/volum (v/v), ca procente de volum (% vol.), părți/milion (ppm), părți pe bilion (ppb; 1 ppm = 1000 ppb).

Concentrațiile maxime admise (CMA) sunt caracteristice fiecărei substanțe din mediul industrial sau comunal, pentru a evita apariția manifestărilor toxice. Ele reprezintă concentrațiile medii ale substanțelor din aer, care, cu excepția cazurilor de hipersensibilitate, nu provoacă, la nici unul din muncitorii expuşi în mod continuu nici un semn sau simptom de boală sau de condiție fizică rea, putând fi pus în evidență prin cele mai sensibile teste acceptate pe scară internațională.

2.5 Doze toxice şi doze letale

Doza toxică se referă la cantitatea de substanță capabilă să determine efecte toxice. Aceasta reprezintă cantitatea din substanță care, introdusă în organism, provoacă un efect toxic determinat. De asemenea, la medicamente se disting doze terapeutice, toxice şi letale. Modul de exprimare a dozei variază: doză/kg masă corporală; doză/masă corporală globală; doză/unitate de suprafață corporală; concentrație molară; unitate biologică etc. Pentru substanțele care au pătruns în organism pe cale orală se face distincție între doza ingerată şi doza absorbită.

Doza letală (DL) exprimă toxicitatea acută a substanțelor care pătrund oral sau parenteral. Se exprimă în mg/kg corp şi se stabileşte experimental pe loturi de animale. DL este urmat de un indice – de la 1 la 100 – exprimând procentul de letalitate într-un timp dat. DL_5 (DLM) este doza letală minimă, DL_{50} (DML), doza medie letală, DL_{75} este doza fatală, iar DL_{100}, doza maximă letală sau doza letală absolută. DL_o , doza maximă tolerată (când se produc efecte toxice, dar nu letale) nu este o doză letală.

În mod curent, pentru exprimarea toxicității acute a unei substanțe se foloseşte noțiunea DL_{50} (mg/kg corp), deoarece la această doză diferențele de reactivitate individuală sunt mai reduse. Substanțele toxice se clasifică şi se compară astfel în raport cu DL_{50} (conform cu scara toxicității).

Aprecierea toxicității acute pe bază de DL_{50} are dezavantajul că nu ține seama de masa moleculară, cu alte cuvinte trebuie să se ia în considerare numărul de molecule implicate în mecanismele fiziopatologice. S-a introdus, de aceea, noțiunea de *potențial de toxicitate*, pT = log [T]. Valoarea T se calculează după valoarea DL_{50} i.p. la şoareci şi reprezintă concentrația molară toxică a substanței, exprimată în moli/kg.

Scara toxicității (după Hodge şi Steaner)

Grupa toxici-tății	Gradul toxici-tății	Calea de administrare			Doza letală probabilă la om (g)	Substanțe
		DL_{50} cutanat iepuri, mg/kg	DL_{50} (doză unică) oral şobolan, mg/kg	Inhalare de vapori (4 ore) mortalitate 30-60% (şobolan) ppm		
1	Extrem de toxic	<5	<1	<10	<0,065	Alcaloizi
2	Foarte toxic	5-43	1-50	10-100	4	Organofosforice, organomercurice, As_2O_3, DNOC
3	Moderat toxic	44-340	50-500	100-1000	31	Metale grele
4	Slab toxic	350-2810	500-5000	1000-10000	570	Aditivi alimentari, Fe, Ni
5	Practic netoxice	2820-22590	5000-15000	10000-100000	1100	Arome alimentare, NaCl, acizi organici
6	Relativ fără toxicitate	>22600	>15000	>100000	>1100	Substanțe alimentare

Concentrația letală în atmosferă (CL) exprimă toxicitatea acută a substanțelor care pătrund pe cale respiratorie şi are aceeaşi semnificație ca şi DL. Exprimarea sa se face astfel:

— masa/volum (g/v);

— volum/volum (v/v), ca procente de volum (% vol.), părți/milion (ppm), părți pe bilion (ppb; 1 ppm = 1000 ppb).

Concentrațiile maxime admise (CMA) sunt caracteristice fiecărei substanțe din mediul industrial sau comunal, pentru a evita apariția manifestărilor toxice. Ele reprezintă concentrațiile medii ale substanțelor din aer, care, cu excepția cazurilor de hipersensibilitate, nu provoacă, la nici unul din subiecții expuşi în mod continuu nici un semn sau simptom de boală sau de condiție fizică rea, putând fi pus în evidență prin cele mai sensibile teste acceptate pe scară internațională.

În raport cu *natura efectului toxic*, substanțele se împart în mai multe grupe, mai importante fiind următoarele două:

- substanțe ale căror efecte principale se traduc prin fenomene de iritație, sensibilizare sau intoxicație acută, apărute imediat sau după o fază de latență, în urma unei expuneri de

scurtă durată la concentrații curente (oxizi de azot, formaldehidă, halogeni, mercaptani etc.). În acest caz CMA sunt denumite *valori plafon*, care nu trebuie depăşite nici chiar timp de 10-15 minute;

- substanțe ale căror efecte principale se datoresc cumulării lor, în urma expunerii repetate la concentrații curente (metale grele, solvenți organici etc.). În acest caz, trebuie considerate drept CMA valorile medii integrate în raport cu timpul, corespunzând noțiunii de *praguri* care nu pot fi depăşite. Ca urmare, aceste concentrații pot fi depăşite în timp şi spațiu, însă este obligatoriu ca, însumate, să se compenseze şi astfel să nu depăşească CMA. De pildă, pentru plumb, expunerea timp de o oră la concentrații de opt ori mai mari decât concentrația medie admisă nu prezintă risc de intoxicație dacă în celelalte şapte ore de muncă plumbul este absent; dimpotrivă, pentru solvenții liposolubili cu acțiune narcotică (dicloretilen, CS_2 etc.), valoarea medie admisă nu poate fi decât foarte puțin depăşită, pe o perioadă extrem de scurtă.

Pentru amestecul de toxici există două modalități de exprimare a CMA, în raport cu modul de dozare:

- dacă toxicii se dozează global, CMA se exprimă în toxicul cel mai agresiv. De exemplu, la amestecul de HCl, H_2SO_4 şi HNO_3, rezultatul se exprimă în mg H_2SO_4/m^3 de aer (CMA = 1,5 mg/m^3) față de ceilalți doi (CMA = 10 mg/m^3).

- dacă toxicii se dozează individual, CMA se consideră global depăşită chiar atunci când concentrațiile individuale (C_1, C_2, C_3…) sunt mai mici decât CMA respective (CMA_1, CMA_2, CMA_3…), însă suma rapoartelor este egală sau mai mare decât unitatea:

$$C_1/CMA_1 + C_2/CMA_2 + \ldots + C_n/CMA_n \geq 1$$

De exemplu, la un amestec de acetonă, alcool izopropilic, cloroform şi alcool amilic, CMA globală este depăşită de 1,5 ori, deşi concentrațiile fiecărui toxic în parte sunt inferioare CMA respective:

$$300/1500 + 240/600 + 80/200 + 125/250 = 1,5 > 1$$

Când suma rapoartelor este inferioară unității, nu există efect aditiv.

Se consideră că au efect sinergic de tip aditiv substanțele toxice care au ca țintă a agresivității lor acelaşi organ sau sistem al organismului ori care au acelaşi mecanism de acțiune. În aceste locuri de muncă aprecierea riscului, respectiv a nivelului noxelor în aer în raport cu concentrațiile admisibile, se va face aplicând următoarea formulă:

$$C_1/CMA_1 + C_2/CMA_2 + \ldots + C_n/CMA_n < 1$$

(C_1, C_2, C_n = concentrațiile determinate în aer pentru fiecare noxă)

(CMA_1, CMA_2, CMA_n = concentrațiile maxime admise pentru noxele respective).

În România, normele de protecția muncii stabilesc următoarele:

- concentrația maximă admisă este concentrația noxelor din zona de muncă ce nu trebuie depăşită în nici un moment al zilei;

- concentrația medie este concentrația noxelor rezultată dintr-un număr de determinări reprezentative pentru locul de muncă ales şi care nu trebuie depăşită pe durata unui schimb de lucru;

- în cazul medicamentelor se determină *indicele terapeutic* (IT) sau *factorul relativ de securitate*, prin raportarea *dozei letale* (DL_{50}) la *doza medie eficace* (DE_{50}) (cantitatea de substanță capabilă să determine efect terapeutic la 50% din subiecții folosiți în experiment). Dacă IT $\geq$ 10, utilizarea substanței în terapeutică nu prezintă pericol la doze uzuale; pentru IT < 10 securitatea tratamentului este scăzută.

3. Istoria toxicologiei medico-legale

Printre primele cărți referitoare la antidoturi se cunosc Theriaca şi Alexipharmaca, scrise de Nicandru din Colofan (sec. II î. H.). Maimonide, filozof şi medic evreu, a scris în sec. XII, un "Tratat despre otrăvuri şi antidoturile lor".

Din secolul al XVIII-lea datează primele lucrări cu scop medico-legal despre otrăvuri. Se cunosc astfel lucrări precum "Asupra otrăvirilor cu arsen; cercetarea şi determinarea lui pentru justiție", elaborată de Hahnemann în 1786 şi "Proprietățile otrăvurilor", un capitol din primul tratat de medicină judiciară scris de Fodéré (1798). Bazele toxicologiei ca ştiință au fost puse de Orfila (1787-1853) prin tratatul său "Toxicologia generală" (1814).

Cu excepția cazului în care cel care s-a otrăvit a fost prins în flagrant, în Evul Mediu nu exista nici o modalitate de a stabili că victima a murit otravită. La începutul secolului al XVIII-lea, un medic olandez, Hermann Boerhoave, a emis ipoteza că ar putea produce diferite parfumuri otrăvitoare. Apoi, Boerhave a fost primul care a sugerat o metodă chimică ce dovedeşte prezența unei otrăvi. În Evului Mediu, asasinii profesionişti şi-au vândut serviciile atât membrilor familiei regale cât şi populației. Cele mai frecvente otrăvuri au fost de origine vegetală (cum ar fi cucuta, aconite, belladonna) şi metalele toxice (săruri de arsenic şi mercur). În timpul Renaşterii franceze şi italiene, asasinatul politic prin otrăvire a fost ridicat la rangul de artă de către Papa Alexandru al VI-lea şi Cesare Borgia.

Primul succes în izolarea unei otrăvi de tip alcaloidic a fost obținut în anul 1850 de către Jean Servials Stas, un chimist belgian, folosind o soluție de acid acetic în alcool etilic pentru a extrage nicotina din țesuturile lui Gustave Fougnie, care fusese ucis. Modificată de chimistul german, Otto Friedrich, metoda Stas-Otto, folosită şi astăzi, a fost rapid aplicată la izolarea a numeroase otrăvuri alcaloidice, inclusiv colchicina, coniina, morfina, narcotina şi stricnina.

Importante contribuții la dezvoltarea toxicologiei au adus Marsh care, în 1836, a elaborat o tehnică pentru decelarea arsenului şi Orfila care a arătat că toxicul trebuie căutat în diferite țesuturi şi organe. Înainte de aceasta (1839), cercetările se făceau numai în stomac, intestine şi vomismente.

Utilizarea de către criminali a arsenicului alb (trioxid de arsen) a devenit atât de larg răspândită în rândul populației din Europa medievală încât otrava a dobândit numele de "pudră de moştenire". Având în vedere această popularitate, este de mirare că prima izolare chimică şi identificare a unei otravi în țesuturile şi fluidele organismului a avut în vedere arsenicul.

În 1775, Karl Wilhelm Scheele, un celebru chimist suedez, a descoperit că arsenicul alb a fost convertit la acid arsenos cu apă de clor. Adaosul de zinc metalic a redus acidul arsenos la un gaz otravitor, arsine (AsH_3). La încălzire uşoară, gazul degajat conduce la

depunerea arsenicului metalic pe suprafața unui vas rece. În 1821, Sevillas a utilizat descompunerea AsH_3 în scopul detectării unor cantități mici de arsenic în conținutul stomacului şi urină, în cazuri de intoxicații. În 1836, James M. Marsh, un chimist de la British Royal Arsenal din Woolwich, s-a folosit de acest gaz (arsine) pentru a dezvolta prima metodă fiabilă de determinare a otrăvii absorbite în țesuturile şi fluidele corpului, cum ar fi ficatul, rinichii şi sângele.

Cercetările au fost dezvoltate în secolul trecut în direcția distrugerii materiei organice, izolării şi identificării toxicilor din produsele biologice. S-au remarcat Fresenius, Babo, Stokes, Stas, Otto, Dragendorff, Tardieu, Roussin, Ogier etc. În secolul nostru, Kohn-Abrest, Fabre, Truhaut, Boudène, Jaulmes, Le Moan, Stepanov, Şvaicova, Clarke, Curry, Sunshine, Müller, Heindrycks, Şt. Minovici, Ioanid, Galea şi alții au elaborat metode valoroase de toxicologie analitică.

În anii 1800 am asistat la dezvoltarea toxicologiei medico-legale ca disciplină ştiințifică. În 1814, Mathieiv J. B. Orfila (1787-1853), "părintele toxicologiei", publicat de „Traité des Poisons” - prima abordare sistemică a studiului naturii fiziologice şi chimice a otrăvurilor. Rolul lui Orfila ca martor expert în studierea multor crime celebre, în special prin aplicarea testului Marsh pentru arsenic în procesul otrăvitorului Marie Lafarge, a stârnit atât interesul popular cât şi ştiințific în noua ştiință. Ca decan al Facultății de Medicină de la Universitatea din Paris, Orfila a instruit mulți studenți în toxicologie medico-legală.

Primul succes în izolarea unei otrăvi de tip alcaloid a fost obținut în 1850 de către Jean Servials Stas, un chimist belgian, folosind o soluție de acid acetic în alcool etilic pentru a extrage nicotina din țesuturile lui Gustave Fougnie, care fusese ucis. Modificată de chimistul german, Otto Friedrich, metoda Stas-Otto a fost rapid aplicată la izolarea a numeroase otrăvuri alcaloidice, inclusiv colchicina, conin, morfina, narcotina şi stricnina; metoda este folosit şi astăzi.

În a doua jumătate a secolului al XIX-lea, toxicologii europeni au fost în avangarda dezvoltării şi aplicării ştiințelor criminaliste. Procedurile au fost dezvoltate pentru a izola şi a detecta alcaloizi, metale grele, şi otrăvuri volatile.

Tot în secolul trecut s-au descoperit şi cercetat compuşi de importanță toxicologică şi criminalistică: Sertürner (morfina, 1805), Pelletier şi Caventou (mai mulți alcaloizi, 1817-1820), Selmi şi Gauthier (ptomaine, 1870-1872), Ogier (glicozizi cadaverici, 1891) etc. În secolul XX s-a dezvoltat biologia moleculară care şi-a pus amprenta şi asupra studiilor de toxicologie medico-legală. În 1948, Druckrey, cercetând dimetilaminoazobenzenul, descoperă că există un efect toxic independent de doză, cu alte cuvinte unii compuşi nu prezintă doză minimă nenocivă. După 1960 s-a stabilit şi faptul că nocivitatea se poate manifesta, în unele cazuri, la descendenți, chiar dacă nu se evidențiază la organismul-receptor (Cotrău, 1993).

Începând cu anul 1958, când, pentru prima dată, Eugen Macovschi a demonstrat existența biostructurii, purtătoarea însuşirilor viului, s-a pus cu totul altfel problema interacțiunii toxic-organism viu. Astfel, toxicul acționează atât asupra materiei moleculare incluse în biostructură şi coexistentă cu aceasta, cât şi direct asupra biostructurii pe care o destramă parțial sau total provocând procese morbide reversibile sau ireversibile. Cu alte cuvinte, este depăşită concepția strict moleculară asupra viului, deşi concepția biostructurală

rămâne tributară viziunii materialiste asupra realității. Moartea organismului are loc, potrivit acestei concepții, în trepte, iar mecanismul acțiunii toxicului implică în mai mare măsură intervenția organismului vătămat. Cercetările efectuate cu azidă de sodiu şi dinitrofenol, de pildă, au arătat că organismele tratate cu aceste substanțe reacționează la acțiunea toxicilor prin eliberarea unei părți din apa inclusă în biostructură, precum şi a unora din componenții săi moleculari.

În America, Rudolph A. Witthaus, profesor de chimie la Universitatea Cornell Medical School, a avut multe contribuții în toxicologie şi a atras atenția asupra noii ştiințe prin efectuarea de analize pentru New York City, în mai multe cazuri celebre de otrăvire: crimele Helen Potts de către Carlyle Harris şi Annie Sutherland de către Dr. Robert W. Buchanan, ambii au utilizat morfină. În 1911, Tracy C. Becker şi profesorul Witthaus a editat o lucrare în patru volume pe tema jurisprudenței medicale, „Medicină Legală şi Toxicologie", primul manual standard de medicină legală publicat în SUA. În 1918, oraşul New York s-a realizat un sistem de examinare medicală, şi numirea lui Dr. Alexandru O. Gettler ca toxicolog a marcat începutul toxicologiei medico-legale moderne în America. Deşi Dr. Gettler a avut multe contribuții în această ştiință, probabil cea mai mare realizare a sa a fost formarea şi orientarea pe care a dat-o viitorilor lideri în toxicologie medico-legală. Mulți dintre asociații lui au continuat această direcție în cadrul laboratoarelor de medicină-legală şi sistemelor de examinare medicală în marile centre urbane din întreaga țară.

În anul 1949 a fost înființată Academia Americană de Ştiințe Medico-Legale, în scopul de a sprijini în continuare practica tuturor fazelor de medicină legală în SUA. Membrii secției de toxicologie reprezintă în marea lor majoritate toxicologi criminalişti care lucrează în birourile de investigații ale procuraturii. O serie de alte organizații de criminalistică internaționale, naționale şi locale, cum ar fi Societatea Toxicologilor Criminalişti şi Asociația Toxicologilor din California, ofera posibilitatea schimbrilor de experiență ştiințifică referitoare la tehnici analitice şi rapoarte de caz, care implică medicamente noi sau rar utilizate şi otrăvuri. Asociația Internațională a Toxicologilor Criminalişti, fondată în 1963, cu peste 750 de membri din 45 de țări, permite cooperarea la nivel mondial în rezolvarea problemelor tehnice cu care se confruntă toxicologul.

În 1975, a fost constituit Consiliul American de Toxicologie Criminalistică, în scopul de a examina şi certifica toxicologii criminalişti. Unul dintre obiectivele sale declarate este "de a crea un sistem judiciar valabil, şi unul public, un sistem practic şi echitabil pentru identificarea cu uşurință a acelor persoane care practică toxicologia medico-legală şi care posedă calificările şi competențele necesare".

În general, aceste persoane autorizate de către Consiliu trebuie să fi obținut titlul de doctor, să aibă cel puțin 3 ani de experiență profesională „full-time", şi să promoveze un examen scris. În prezent, doar circa 200 de toxicologi sunt certificați de către acest Consiliu.

În țara noastră, primul toxicolog criminalist este considerat farmacistul şi medicul C. Hepites care a avut, începând cu anul 1833, un laborator de analize chimico-legale la Brăila. După 1890 toxicologia a fost reprezentată de Mina Minovici, farmacist şi medic, întemeietorul Institutului de Medicină Legală din Bucureşti. Fratele său, Ştefan Minovici, deşi chimist, a reorganizat învățământului farmaceutic şi a întemeiat Facultatea de Farmacie din

Bucureşti (1923); a elaborat, printre altele, şi un manual de toxicologie (1912). Printre colaboratorii şi urmaşii săi au fost Bacovescu, Vintilescu, Deleanu, Ionescu-Matiu. În Transilvania, medicul, chimistul şi farmacistul J. Orient a publicat numeroase lucrări de toxicologie. La Iaşi a activat în domeniul toxicologiei judiciare dr. Cotrău.

La Bucureşti, N. I. Ioanid publică în 1965 un manual de referinţă în domeniu: ”Toxicologie”. La Cluj activează prof. V. Galea, autor a numeroase lucrări de toxicologie teoretică şi practică.

4. Otrăvirea şi cercetarea criminalistică

În general, cazurile de crimă cu otravă sunt comise doar în cadrul unei familii sau într-un grup de aproapiaţi. În astfel de cazuri, asasinul foloseşte, în general, unele otrăvuri care nu pot trezi suspiciuni datorită culorii, mirosului sau gustului acestora. Uneori se semnalează şi omorul sau tentativa de omor prin folosirea de gaze toxice, de exemplu, cu monoxid de carbon.

Confirmarea cazului de moarte prin otrăvire se realizează prin colaborare între medicul legist şi toxicolog. Rareori cercetarea la faţa locului aduce dovezi fizice care indică faptul că moartea a fost cauzată de ingestia unor substanţe otrăvitoare. Stabilirea cauzei decesului revine personalului medical calificat, medicului legist sau anatomopatologului, dar succesul sau eşecul în a ajunge la o concluzie corectă depinde frecvent de eforturile combinate ale anatomo-patologului şi toxicologului criminalist. Otrăvirea, ca şi cauză a decesului, nu poate fi dovedită fără a analiză toxicologică care să demonstreze prezenţa otrăvii în ţesuturile sau fluidele corporale ale decedatului. Cele mai multe droguri şi otravuri nu produc leziuni caracteristice sau vizibile în ţesuturile corpului, iar prezenţa lor poate fi demonstrată doar prin metode chimice de izolare şi identificare. În cazul în care analizele toxicologice sunt evitate, moartea poate fi atribuită otrăvirii fără o dovadă certă sau o moarte prin otrăvire poate fi în mod eronat atribuită altor cauze.

Graniţa dintre substanţele otrăvitoare şi cele netoxice este greu de determinat. Unele substanţe prezente în produsele alimentare pot cauza moartea prin otrăvire, atunci când sunt luate în cantităţi mari. Astfel, există un caz în care consumul de 13 de grame de sare de masă a provocat moartea a unui adult.

Probele fizice aflate la locul crimei şi examinarea sumară a decedatului pot indica uneori un caz de otrăvire. Patologul poate recunoaşte efectele anumitor otrăvuri la autopsie. Acizii tari şi bazele pot provoca arsuri extinse în jurul gurii sau pe suprafaţa corpului, cu distrugerea severă a ţesuturilor interne. Dovezi, cum ar fi droguri, narcotice, marcaje pe corp sau prezenţa acizilor sau a substanţelor caustice pot conduce la ipoteza otrăvirii. De asemenea, arsurile în jurul gurii şi pe faţă pot fi rezultatul consumului de acizi sau substanţe chimice caustice, cum ar fi acidul clorhidric, acidul sulfuric sau a leşiei. Mirosurile de amoniac sau migdale amare pot indica anumite otrăvuri. De pildă, în intoxicaţia cu cianură, faţa este de culoare roşiatică.

Anumite medicamente, cum ar fi alcaloizii din opiu şi nicotina pot cauza contracţia pupilelor, în timp ce altele, cum ar fi atropina (belladonna) produc dilatarea.

Stricnina provoacă convulsii, colțurile gurii fiind ridicate, iar fața este rigidizată într-un rânjet, în timp ce brațele şi picioarele sunt trase împreună, pe când partea din spate este puternic îndoit înapoi datorită contracției muşchilor.

Dacă moartea a survenit prin otravire subacută sau cronică cu arsenic, fecalele vor avea o consistență moale şi, de multe ori, conțin sânge. O excreție mărită se găseşte, de obicei, în etapele târzii ale intoxicației cu clorură mercurică sau cu săruri de plumb.

Diferite materiale colorate aflate în vomă pot indica tipul de otrăvire. Astfel, culoarea maro asemănătoare cu zațul de cafea indică o otrăvire cu baze tari, cum ar fi de hidroxidul de sodiu sau potasiu; galbenul conduce la acid azotic şi acizii cromului; albastru-verde la sulfat de cupru; negru, la acid sulfuric, iar culoare verde-maro sugerează înghițirea de acid clorhidric. O vomă cu miros ascuțit indică o otrăvire cu amoniac sau cu acid acetic.

Intr-un caz de deces prin otrăvire, numai o anchetă la fața locului şi audierea martorilor ar putea decide dacă a fost un caz de crimă, sinucidere sau accident. Autopsia poate stabili numai tipul şi cantitatea de otravă utilizată.

Cele mai cunoscute substanțe otrăvitoare sunt:

- Otrăvurile lichide şi gazoase. Cele mai cunoscute sunt monoxidul de carbon, acidul cianhidric, freonul, metanolul, toluenul, benzenul, gazolina şi cloroformul.
- Metalele grele şi alte otrăvuri anorganice. Compuşii şi sărurile de antimoniu, arsenicul, bariul, cromul, plumbul, mercurul, taliul, precum şi acizii şi bazele anorganice puternice, cum ar fi acidul clorhidric, acidul azotic, acidul sulfuric, hidroxidul de sodiu, hidroxidul de potasiu şi amoniacul.
- Drogurile ilicite, medicamentele aflate în regim special şi băuturile spirtoase. Unele medicamente pot fi găsite în asociere cu altele asemenea sau cu alcool. Grupa de astfel de substanțe cuprinde alcoolul etilic, barbituricele, heroina, opiaceele sintetice, cum ar fi metadona, fenciclidină (phencyclidine, PCP), tranchilizantele minore, cum ar fi Valium, Librium, meprobamatul sau medicamentele cu regim special, atunci când sunt luate în exces.
- Unele otrăvuri animale şi vegetale: atropină, cocaina, nicotina, scopolamina, stricnina şi veninul de şarpe.
- Otrăvuri bacteriene şi intoxicații alimentare (botulism).

4.1 Otrăvirea accidentală

Cele mai multe intoxicații accidentale au loc în casă. Copiii pot avea acces şi chiar ingera medicamente, detergenți, pesticide şi detergenți de uz casnic. Intoxicația accidentală la adulți este de obicei rezultatul etichetării greşite sau depozitării unei substanțe toxice într-un alt recipient decât cel original. De câte ori nu, un recipient necorespunzător este o veche sticlă de whisky! Arsenicul, buruienile otrăvitoare, stricnina, cianurile, soluțiile de curățare, şi numeroase alte otrăvuri letale au fost cu nerabdare şi din greşeală băute din ulcioare de cidru şi sticle de whisky vechi. Este cunoscut cazul în care un flacon deschis de cianură, aflat lângă o cutie de zahăr pe o masă de lucru la subsol, a fost folosit pentru a îndulci o ultimă ceaşcă de cafea.

Intoxicațiile accidentale pot apărea în industrie, ca urmare a neglijenței sau unor întâmplări nefericite, care expun lucrătorii la substanțe toxice. În timp ce posibilitatea de otrăvire accidentală în industrie este mare, standardele de siguranță şi reglementările şi disponibilitatea serviciilor medicale de urgență din prezent împiedică industria să constituie sursa a multe intoxicații fatale.

4.2. Decese cauzate de abuzul de droguri

Drogurile sunt folosite în scopul schimbării stării sufleteşti sau inducerii unei stări de euforie reprezintă sursa a numeroase intoxicații. Abuzul de droguri poate implica utilizarea de droguri ilegale, cum ar fi heroina sau phencyclidina; consumul de droguri interzise sau controlate, cum ar fi cocaina, barbituricele şi amfetamina sau utilizarea de produse chimice în alt mod decât cel prescris, deci contrar destinației lor - cum ar fi inhalarea de solvenți şi produse volatile. Dat fiind că dezvoltarea şi glorificare a "culturii drogurilor" la mijlocul anilor 1960, decesele datorate de consumul de droguri ilicite sunt cele mai frecvente intoxicații fatale investigate de către toxicologi, în special în zonele urbane mari.

Tabelul următor prezintă drogurile cel mai frecvent întâlnite în investigațiile de deces; de remarcat incidența ridicată a cocainei, alcoolului, heroinei şi morfinei. Într-un sens mai larg, abuzul de droguri poate include, de asemenea, utilizarea excesivă a substanțelor legale, cum ar fi alcoolul şi medicamentele pe bază de prescripție. Consumul de alcool este cea mai mare problemă a drogurilor în SUA. Alcoolul joacă un rol semnificativ în decesele violente. Din cele 40.000 de decese datorate accidentelor de maşină care au loc anual în SUA, 50% implică şoferi consumatori de alcool, şi 60% din pietonii ucişi au concentrații semnificative de alcool din sânge.

Droguri frecvent întâlnite în cazurile cercetate medical, 1991[a]

Nr. crt.	Denumire drog	Număr de mențonări	Procent[b] din total cazuri
1	Cocaină	3020	45.75
2	Alcool-în combinație	2436	36.90
3	Heroină/Morfină	2333	35.30
4	Codeină	783	11.86
5	Diazepam	587	8.89
6	Amitriptilină	437	6.62
7	Metadonă	430	6.51
8	Nortriptilină	379	5.74
9	d-Proxpoxifenă	325	4.92
10	Difenhidramină	241	3.65

[a] Drug Abuse Warning Network, National Institute on Drug Abuse date din 27 oraşe

[b] Procent din total cazuri poate depăşi 100%, deoarece un caz poate implica mai mult de un drog

Dintre adulții din mediul urban care au fost internați într-un spital, cu un os fracturat, 50% şi-au fracturat osul în timpul sau după consumul de alcool. Un nivel ridicat de alcool în sânge se găseşte la autopsie, în 35% din cazurile persoanelor care s-au sinucis şi în 50% din toate victimele crimelor. De asemenea, mulți oameni mor în fiecare an din cauze patologice, multe direct atribuite alcoolului sau complicațiilor altor cauze patologice, agravate de consumul de alcool. Alcoolul este o otravă cu autolimitare: de obicei, oamenii îşi pierd conştiința înainte de a ingera o doză letală. Prin urmare, decesele prin supradozare, din cauza ingestiei de cantități excesive de alcool sunt mai puțin frecvente. Cu toate acestea, numeroase decese accidentale apar din ingestia simultană de medicamente puternice şi alcool.

4.3 Sinuciderea cu otravă

Metoda obişnuită de deces prin otrăvire este sinuciderea. În general, de două ori mai mulți bărbați decât femei săvârşesc cu succes o sinucidere. Cu toate acestea, de două ori ca multe femei decât bărbați încearcă să se sinucidă cu otravă. Cel mai comun mijloc de sinucidere este monoxidul de carbon, un gaz generat de arderea incompletă a compuşilor cu carbon. Gazele de eşapament de la automobile conțin o concentrație ridicată de monoxid de carbon. O metodă obişnuită folosită de către cei care se sinucid cu monoxid de carbon este lăsarea unui motor de maşină pornit într-un garaj închis.

În timp ce arsenicul, cianura şi alte otrăvuri bine cunoscute pot fi uneori utilizate ca agenți de sinucidere, cele mai multe decese rezultă ca urmare a consumului de medicamente. Persoanele care suferă de depresie şi alte tulburări emoționale, de obicei, au la dispoziție medicamente puternice şi, dacă sunt luate în exces, pentru a combate simptome ale tulburărilor psihologice aceste droguri sunt letale. Astăzi, cele mai multe sinucideri prin otrăvire implică ingerarea mai multor medicamente, de obicei trei până la şapte medicamente diferite sunt ingerate odată. Prin analiza conținutului gastric şi al intestinului, a urinei, a sângelui, a organelor principale ale corpului, toxicologul poate determina cantitatea minimă a otravă ingerată. În sinucideri, rezultatele acestor analize demonstrează că a fost ingerată o cantitate masivă; aceasta înseamnă, dincolo de orice îndoială, că răposatul nu ar fi putut lua accidental o astfel de doză.

4.4 Otrăvirea criminală

Otrăvirile accidentale şi sinuciderile sunt comune astăzi; crima prin otrăvire este rară. Concluzia că o persoană a murit ca urmare a otrăvirii de către un criminal este de multe ori cel mai dificil tip de investigație pentru oamenii legii şi experții medicali. În general, dovada de otrăvire se obține din cunoaşterea simptomelor manifestate de răposat înainte de moarte, examinarea postmortem a corpului de către anatomopatolog, şi izolarea şi identificarea otrăvii de către toxicolog. Pentru urmărirea cu succes a unui suspect, oamenii legii trebuie să stabilească că făptaşul a avut acces la o sursă de otravă, că suspectul a fost conştient de efectele letale ale otrăvii şi că suspectul a avut posibilitatea de a administra otrava răposatului.

În cazul în care victima a fost consultată, înainte de moarte, de către un medic, medicul nu consideră otrăvirea ca o cauză a necazului pacientului. Numai în cazul în ocupația pacientului îl aduce în contact cu substanțe toxice (lucrează într-o rafinărie, mediu chimic sau în topitorii; lucrează la o fermă şi utilizează pesticide şi erbicide) va medicul suspecta o intoxicație chimică. Crima prin otrăvire apare cel mai frecvent în cadrul familiei, acasă, iar medicul va suspecta rareori un soț supraviețuitor, soția, fiul sau fiica de otrăvire a unui alt membru al familiei. De asemenea, există rareori un simptom de otrăvire care nu poate fi la fel de bine cauzate de boala.

Vărsăturile, diareea, colapsul rapid şi pulsul slab, adică toate simptomele otrăvirii cu arsenic pot fi, de asemenea, şi cauza unui ulcer gastric perforat sau a unei inflamații a pancreasului sau apendicelui. De asemenea, convulsiile cauzate atât de stricnină cât şi de tetanos. Pupilele contractate şi narcoza pot fi cauzate de stupefiante sau de leziuni cerebrale. Cu toate acestea, există circumstanțe care fac un diagnostic de otrăvire aproape sigur.

Debutul şi evoluția simptomelor către o moarte rapidă, imediat dupa servirea mesei sau după consumarea unui pahar indică intoxicații acute, deoarece intoxicația alimentară bacteriană are un debut întârziat al simptomelor.

Otrăvurile metalice pot provoca deteriorarea severă a tractului gastro-intestinal, ficatul şi rinichii. Fosforul, hidrocarburile clorurate şi ciupercile otrăvitoare cauzează degenerarea severă a ficatului. Cu toate acestea, cele mai multe otrăvuri nu produc modificări observabile în țesuturi, prin urmare, în multe cazuri de otrăvire, evaluarea corpului de către anatomopatolog stabileşte dacă moartea s-a datorat unor cauze naturale sau unor leziuni traumatice şi că nu există nici o dovadă pentru cauza de deces, cu excepția unei posibile otrăviri. În majoritatea cazurilor, analiza toxicologică aduce dovezi pentru crima prin otrăvire.

4.5 Dovezi circumstanțiale de otrăvire

Ancheta toxicologică ale unei morți prin otrăvire poate fi împărțită în trei etape:

1. Obținerea studiilor de caz şi a probelor (dovezilor) adecvate;
2. Analizele toxicologice;
3. Interpretarea rezultatelor analizelor.

Stabilirea cauzei de deces drept otrăvire se poate face numai prin autopsie şi analiză chimică. Într-un număr de cazuri de intoxicații, aspectul persoanei decedate sau circumstanțe speciale în legătură cu moartea poate conduce la aflarea cauzei de deces.

Trebuie, de asemenea, căutate, în primul rând, la locul incidentului otrăvurile reziduale, sub formă de comprimate, pulbere, sau reziduuri în flacoanele de medicamente. De asemenea, se vor căuta ambalajele, prafurile, cutiile aruncate şi alte recipiente (tuburi, fiole, flacoane). Toate indicile trebuie recuperate şi ambalate separat, într-un tub sau plic. Atunci când persoana decedată se găseşte în pat, trebuie examinată foarte atent lenjeria de pat deoarece poate conține otravă sub formă de pulbere, dar şi alte substanțe deversate, greu de detectat.

În cazurile în care moartea nu se datorează otrăvirii, toxicologul criminalist poate oferi, de cele mai multe ori, dovezi incontestabile cu privire la împrejurările în care a avut loc

un deces. Comportamentul de conducere haotică a victimelor accidentelor auto este adesea explicat prin prezența alcoolului în sânge sau țesuturi. Medicamentele psihoactive, cele care afectează comportamentul, joacă adesea un rol semnificativ în împrejurări asociate cu moartea subită sau violentă. Detectarea alcoolului, a narcoticelor, a halucinogenelor sau a altor medicamente pot susține depozițiile martorilor cu privire la comportamentul agresiv, incoerent, sau irațional al răposatului în momentul unui incident fatal. În schimb, rezultatele toxicologice negative pot spulbera suspiciunea consumului de droguri a răposatului. Concluziile negative sunt, de asemenea, semnificative la persoanele care sunt în mod regulat sub tratament pentru a controla condițiile patologice. În cazul epilepticilor, concentrațiile scăzute sau negative de droguri pot indica faptul că răposatul nu şi-a luat medicamentele în modul prescris şi ca urmare, au suferit un atac de apoplexie fatal.

4.6 Metode de analiză criminalistică a opioidelor

Utilizarea unor metode de separare pentru izolarea, identificarea şi analiza cantitativă a opiaceelor naturale şi sintetice prezintă un larg interes pentru criminalişti (Bogusz, 2008). Strict vorbind, termenul de opiaceu se referă la produsele derivate din opiu de mac. Atenția criminaliştilor se concentrează pe derivați de morfină şi opiacee sintetice sau semisintetice, cu acțiune agonală (agonistic) la receptorii opioizi OP1 (d), OP2 (k) sau OP3 (m). Pentru acțiunea opiaceelor asupra receptorilor opioizi pot fi consultate şi alte lucrări (Kilpatrick & Smith, 2005; Dhawan *et al.*, 1996). Aici ne interesează mai ales aplicațiile analizei medico-legale, dedicat în principal probelor biologice. Aceste aplicații cuprind metodele de detectare a opiaceelor în probele non-biologice şi biologice; izolarea de opioide din matrici biologice diferite; analiza constituienților opiului de mac în materiale vegetale şi în fluidele organismului; separarea şi detectarea heroinei şi metaboliților sau a congenerilor săi în preparate ilicite de droguri sau medicamente, precum şi în fluidele organismului; analiza morfinei şi a altor opiacee naturale şi sintetice în fluidele organismului şi în organe. In acest scop sunt necesare tehnici de separare relevante: cromatografia în strat subțire (TLC), gaz-cromatografia (GC), cromatografia de lichid de înaltă performanță (HPLC) şi electroforeza capilară (CE), combinate cu diferite metode de detecție.

Testele preliminare trebuie să prezinte o specificitate largă de grup şi, eventual, o sensibilitate ridicată, în timp ce specificitatea absolută nu este necesară. O identificare fără echivoc şi determinarea cantitativă sunt de obicei efectuate în etapa de confirmare a analizei. Deoarece un rezultat negativ la un test preliminar este de obicei decisiv, nu se iau în considerare rezultatele fals negative.

4.7 Metode preliminare utilizate la depistarea drogurilor în stradă

Dispozitivele de testare folosite curent sunt simple şi robuste şi se bazează de regulă pe reacții de culoare bine-cunoscute. Testele preliminare se execută, de obicei, de către polițişti sau vameşi. Sarcina principală a acestor teste este selecția probelor sau a materialelor suspecte pentru examinarea lor ulterioară cu metode confirmatorii. Narcopouchs®, de pildă, reprezintă un kit de teste de culoare pentru detectarea opiaceelor, amfetaminei, cocainei, barbituricelor,

canabinoizilor şi a dietilamidei acidului lisergic (LSD) în probe colectate pe stradă (ODV Inc, Paris, ME, SUA). Acest test foloseşte reacţii de culoare cu mai mulţi reactivi, cum ar fi reactivii Marquis, Meyer, Mecke, Ehrlich, Fast Blue B şi Koppanyi. Intreaga procedură se realizează în cutii de plastic prin care se poate vedea reacţia de culoare. Kit-ul Herosols® (Mistral Detection Ltd., Jerusalem, Israel) constă dintr-un reactiv pentru pulverizare şi hârtia specială de testare. Astfel, pielea suspectului este ştearsă/tamponată cu o bucăţică de hârtie, pe care este apoi pulverizat Herosol. O culoare violet indică prezenţa heroinei. Un test similar pentru heroină, numit Detect Now™ este oferit de Test Medical Symptoms@Home, Inc. şi a fost comercializat prin intermediul internetului ca un test simplu pentru părinţii care doresc să verifice dacă copiii lor consumă droguri. NIK® (Public Safety Inc., Armor Holding, Jacksonville, FL, USA) reprezintă un alt kit ce cuprinde fiole pentru principalele clase de droguri printre care opiacee/amfetamine, heroină/opiu. Drug Wipe şi Drug Wipe II (Securetec AG, Germany) sunt concepute ca teste imunochimice pentru detectarea drogurilor pe suprafeţe diferite, de exemplu, în bagaje, paşapoarte, valută, şi, de asemenea, pe piele, pe limbă sau în transpiraţie. Limita de detecţie pentru opiacee este de 25 ng de echivalent morfină. Cu un cititor portabil se poate efectua determinarea cantitativă colorimetrică.

4.8 Metode folosite pentru fluidele biologice

Metodele preliminare utilizate pentru fluide biologice pot fi împărţite în teste *on-site* şi teste de laborator. Totuşi, testele preliminare pot fi folosite nu doar în scopuri judiciare sau preventive, de exemplu, în scanarea angajaţilor, dar şi ca o procedură de diagnosticare în intoxicaţii acute suspecte. În testele *on site* (la faţa locului) aplicate într-o secţie de urgenţă, confirmarea analizelor nu este întotdeauna de maximă importanţă. Rezultatul pozitiv al unui test preliminar de opiacee într-un caz de supradoză cu heroină reprezintă un indiciu pentru administrarea unui antagonist al opiaceelor, de exemplu, naloxonă, în loc să se aştepte rezultatele analizei confirmatorii. Această practică nu se limitează numai la domeniul sănătăţii publice; distribuirea de naloxonă pentru administrare acasă dependenţilor de către membrii familiei este o nouă abordare în combaterea efectelor drogurilor, care este testată în SUA, Germania şi Regatul Unit (Sporer, 2003).

Teste pe teren

Aceste teste sunt utilizate pe scară largă pentru grupuri sociale foarte diferite, incluzând şoferii de automobile, criminalii din puşcării, militarii, sportivii, angajaţii din industria petrolieră, etc. Se pot testa astfel şi indivizii din zonele îndepărtate. Cel mai important aspect este posibilitatea de a folosi de eşantionare non-invazive. Din acest motiv, testele pe salivă sau transpiraţie au devenit deosebit de atractive în locul celor pe urină sau sânge (Jenkins & Goldberger, 2002).

S-a realizat o astfel de evaluare utilizând cinci dispozitive de testare a drogurilor pe teren, şi anume, AccuSign, Rapid Drug Screen, TesT-Cup-5, TesTstik şi Triage. Au fost colectate şi testate patru sute de probelor de urină, iar rezultatele pozitive au fost confirmate folosind cromatografia de gaz cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS), pentru morfină şi

codeina sau prin lichid cromatografie-spectrometrie de masă (LC-MS), pentru hidrocodona şi hidromorfonă (Crouch et al. [5]). A fost observat numai un rezultat fals-negativ. Rata de rezultate fals-pozitive a fost sub 0,25% pentru toate dispozitivele de testare utilizate. Gronholm şi Lillsunde [6] au evaluat opt dispozitivele de teren pentru depistarea de opiacee şi alte droguri în urină şi prin analiza fluidelor orale. Rezultatele testelor pot fi văzute în Tabelul 1.

Un alt sistem pentru analiza drogurilor la faţa locului, ORALscreen System, a dat rezultate concordante cu cele din laborator chiar după 2-3 zile de la consumul de droguri (Barrett et al. [9]).

Teste pentru detecția pe teren a opiaceelor în fluidele corpului (după Bogusz, 2008).

Dispozitivul de testare	**Producător**	**Calibrare**	**Limita de detecție (ng/ml)**	**Materialul biologic analizat**
AccuSign	www.pbmc.com	Morfină	300	Urină
Instant-View™ Morphine	www.alcopro.com	Morfină	300	Urină
ONTRAK TesTcup	www.rochediagnostics.com	Morfină	300	Urină
ONTRAK TesTStik	www.rochediagnostics.com	Morfină	300	Urină
Rapid Drug Screen	www.bioscaninc.com	Morfină	300	Urină
Syva RapidTest	www.dadebehring.com	Morfină	300	Urină
Triage DOA	www.biosite.com	Morfină	300	Urină
Cozart RapiScan	www.cozart.co.uk	Morfină	10	Salivă

Testele de laborator

Testele de laborator sunt utilizate în situațiile în care numărul de probe examinate este destul de ridicat, de exemplu, în screening-ul de droguri în cazul angajaților sau a personalului militar. Aceste teste sunt de regulă bazate pe principiul testelor imunologice şi se referă nu numai la opiacee, dar şi la alți compuşi, cum ar fi amfetaminele, cocaina, benzodiazepinele, barbituricele, canabinoizii şi metadona. Toate kit-urile detectează o gamă largă de opiacee, inclusiv cu morfina şi glucuronoconjugații săi, codeina, opiaceele semisintetice, cum ar fi dihydrocodeine (DHC) sau hidrocodona. Excepție face metoda CEDIA® 6-AM (dezvoltată de Microgenics, Fremont, CA, USA), care este selectivă pentru 6-monoacetylmorphine (metabolitul primar al heroinei). George şi Parmar [10] au analizat 1100 probe de urină cu CEDIA® 6-AM şi nu au reuşit să confirme 21 din 282 de probe pozitive, care au fost identificate cu ajutorul GC-MS. Performanța testului CEDIA® 6-AM de la Microgenics a fost, de asemenea, evaluată (Holler et al. [11]) pe un total de 37713 probe de urină de la de membri serviciului militar activ. Trei soldați au fost depistați pozitiv, la o limită 10 ng/ml, iar una dintre cele trei probe a fost confirmată pozitiv şi prin GC-MS, în timp ce celelalte două eşantioane nu au fost confirmate la limita de detecție (LOD) de 2,1 ng/ml. În plus, 87 probe

de urină umană cunoscute pentru conținutul lor de 6-AM (prin GC-MS) au fost re-analizate cu ajutorul testului CEDIA® 6-AM când s-au obținut rezultate pozitive.

Unele teste preliminare au fost adaptate pentru probele postmortem. Astfel, a fost aplicat testul ELISA pentru screening în cazul abuzului de droguri utilizând pentru analiză omogenatele tisulare şi sângele colectate postmortem (Moore et al. [17]).Testul pentru morfină a fost foarte specific pentru morfina liberă, dar mai puțin sensibil decât screening-ul celorlalte opiacee. Acesta din urmă a fost recomandat pentru screening-ul specimenelor postmortem. Când s-a evaluat testul ELISA comercial pentru screening-ul opiaceelor şi benzodiazepinei în probe de sânge postmortem, în raport cu tehnica GC-MS, s-a găsit o sensibilitate de 95% şi o specificitate de 92% față de GC-MS (Kemp et al. [18]). Limita de detecție a fost 20 μg/l echivalent morfină.

Utilizarea la scară largă şi importanța testului antidrog a creat o piață ilegală pentru proceduri şi produse care promit să "bată" testele. În afară de diluarea urinei prin consum excesiv de alcool sau substituirea probelor, mai mulți producători oferă diferite kit-uri (seturi) şi reactivi, care pot fi adăugate în urină, pentru a evita detectarea drogurilor. Ca o contramăsură la falsificare, pot fi aplicate următoarele etape: măsurarea temperaturii, greutății specifice, pH-ului şi conținutului de creatinină în urină, precum şi utilizarea de teste chimice specifice pentru depistarea adaosurilor de compuşi chimici. Cody şi colaboratorii săi [21,22] a examinat influența falsificatorului *Stealth* asupra detectabilității morfinei sau codeinei în probele de urină. *Stealth* conține peroxidază şi peroxid şi este considerat de producător ca nedetectabil prin teste de depistare a falsificării. S-a demonstrat că probele cu concentrații scăzute de morfină şi codeină (2,5 μg / l urină) dau un răspuns negativ atât la examinarea imunochimică şi prin GC-MS, în timp ce parametrii tipici ai urinei au rămas neschimbați. Microgenics a dezvoltat un test special numit *Sample Check* care detectează orice interferență posibilă cu testul CEDIA® în caz de alterarea eşantionului. Acest test înlocuieşte un grup complex de teste de alterare.

5. Studii de caz şi probe

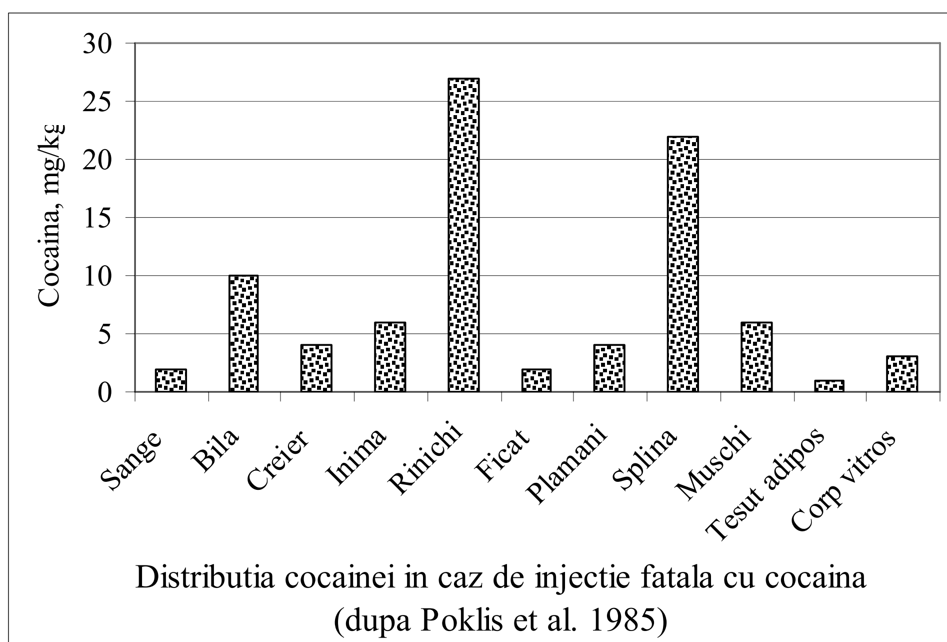
Astăzi, sunt uşor accesibili publicului mii de compuşi care sunt letali dacă sunt ingerați, injectați sau inhalați. Toxicologul are doar o cantitate limitată de materiale pe care să efectueze analizele; prin urmare, este imperios necesar ca, înainte de a începe analizele să obțină cât mai multe informații posibil cu privire la împrejurările cazului.

Înainte de începerea analizei, toxicologul trebuie să ia în considerare mai mulți factori: cantitatea de probă disponibilă, natura otrăvii căutate şi posibila biotransformare a otrăvii. Pentru că lucrează cu o cantitate limitată de probă, toxicologul trebuie să elaboreze o metodă analitică, ce va permite detectarea unui număr cât mai mare de compuşi.

Toxicologul trebuie să țină cont de vârstă, sex, greutate, istoricul medical şi ocupația răposatului, precum şi de orice tratamente au fost administrate înainte de moarte, constatările preliminare ale autopsiei, medicamentele care au fost la îndemâna răposatului, precum şi intervalul de timp dintre debutul simptomelor şi moarte. Într-un an, laboratorul de toxicologie afiliat cabinetului unui medic legist va efectua analize asupra țesuturilor pentru diverse otrăvuri, cum ar fi diverse medicamente (analgezice, antidepresive, hipnotice, tranchilizante),

consumului de droguri (halucinogene, narcotice, stimulente), produse comerciale (antigel, produse de aerosoli, insecticide, rodenticide, plante toxice), şi gaze (monoxid de carbon, cianură).

Evident, posibila identificare a otrăvii înainte de analiză ar ajuta foarte mult. Colectarea probelor pentru analizele toxicologice este de obicei efectuată de către patolog la autopsie. Sunt necesare mostre din numeroase fluide ale corpului şi organe, deoarece drogurile şi otrăvurile au afinități diferite pentru țesuturile organismului (a se vedea tabelul următor). Drogurile şi otrăvurile nu sunt distribuite uniform în tot organismul, iar toxicologul, de obicei, analizează mai întâi organele care sunt predispuse a avea cele mai mari concentrații de droguri (vezi figura următoare). Pentru analiza toxicologică detaliată este necesară o cantitate mare din fiecare mostră, deoarece o procedură prin care se extrage şi se identifică un compus sau clasă de compuşi poate fi ineficientă în extragerea sau identificarea altora.



Distributia cocainei in caz de injectie fatala cu cocaina (dupa Poklis et al. 1985)

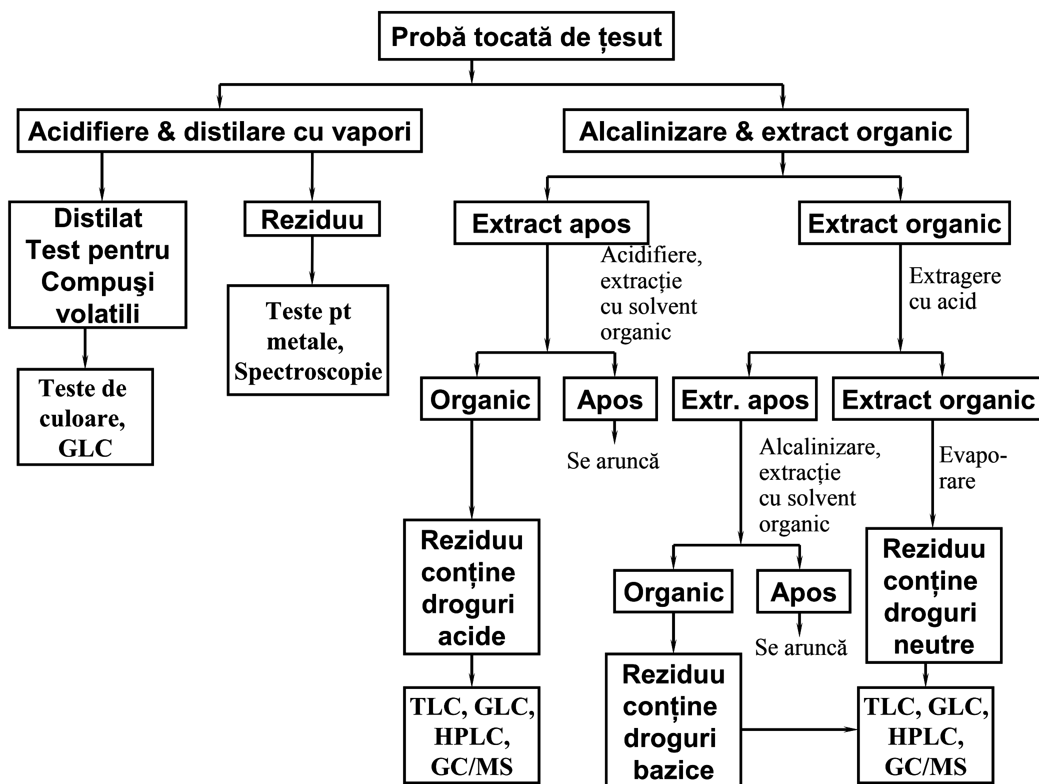
În colectarea probelor, patologul etichetează fiecare recipient cu data şi ora autopsiei, numele răposatului, numărul probei şi semnătura patologului. Toxicologul, la primirea probelor, dă patologului o dovadă scrisă şi depozitează probele într-un frigider încuiat până la momentul analizei. Această procedură oferă un traseu adecvat probelor, care permit toxicologului să introducă rezultatele sale în orice procedură juridică decurge din cazul analizat.

Probele ar trebui să fie colectate înainte de îmbălsămare, deoarece acest proces poate distruge sau dilua otrăvurile prezente şi poate face imposibilă detectarea acestora. De exemplu, cianura este distrusă de procesul de îmbălsămare. Învers, alcoolul metilic sau cel etilic poate fi o componentă a unui fluid îmbălsămare, dând astfel o indicație falsă despre ceea ce a băut răposatul înainte de moarte.

Probele colectate la autopsie pentru analize toxicologice

Proba	Cantitate	Toxicul urmărit
Țesut adipos	200 g	Insecticide, Tiopental
Bilă	cât este disponibil	Codeină, Morfină
Sânge	15 ml	Clcooli, monoxid de carbon
Creier	500 g	Otrăvuri volatile
Rinichi	un organ întreg	Metale grele
Ficat	500 g	Cei mai mulți toxici
Plămân	un organ întreg	Metadonă, gaze, inhalante
Conținut stomacal şi intestinal	cât este disponibil	Toți toxicii luați oral
Urină	cât este disponibil	Cei mai mulți toxici
Umoare vitroasă	cât este disponibil	Digoxină, electroliți, glucoză

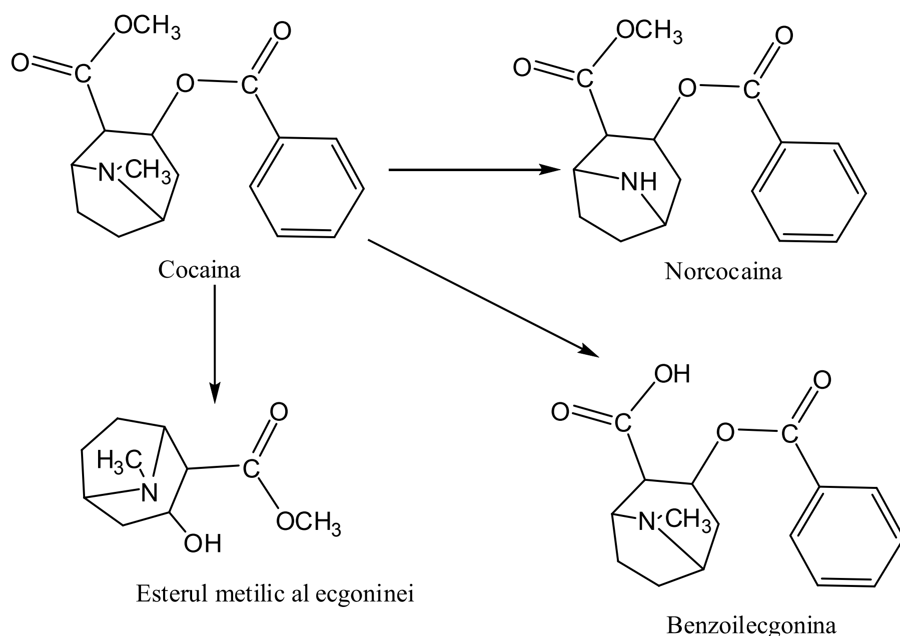
Se prezintă o schemă de izolare a otrăvurilor când compusul căutat nu este cunoscut. În cazurile care implică administrarea orală a unei otrăvi, este analizat în primul rând conținutul gastro-intestinal, deoarece cantități mari de otravă reziduală neabsorbită pot fi prezente.



Schema de izolare a otrăvurilor din probele aduse la laborator

În continuare poate fi analizată urina, deoarece rinichii sunt organe principale de excreție pentru cele mai multe otrăvuri şi concentrații mari de substanțe toxice sunt adesea prezente în urină. După absorbția de la nivelul tractului gastro-intestinal, drogurile sau otrăvurile sunt primele transportate la ficat, înainte de a intra în circulația generală sistemică, şi prin urmare, prima analiză a unui organ intern este realizat asupra ficatului. Dacă o anumită otravă este suspectă sau cunoscută a fi implicată într-o moarte, toxicologul alege pentru primele analize aceste țesuturi şi fluide în care otrava se află concentrată.

Biotransformarea sau metabolizarea sunt termeni echivalenți folosiți pentru a indica procesul de conversie al unei substanțe chimice străine în organism, la un produs chimic diferit din punct de vedere structural. Noul compus este numit metabolit. Biotransformarea unui medicament sau a unei otrăvi, de obicei, dar nu întotdeauna, conduce la formarea unei substanțe inactive punct de vedere fiziologic, care este mai uşor de eliminat din organism decât compusul de plecare.



Metabolizarea cocainei in corp

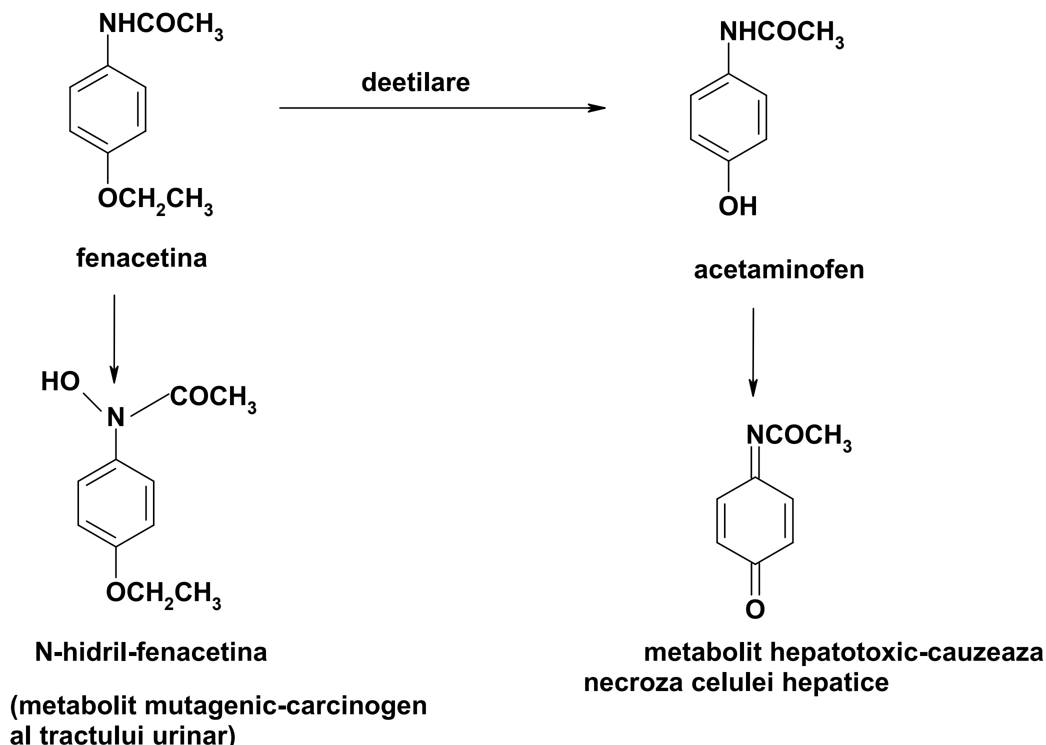
Figura de mai sus prezintă biotransformarea cocainei. Metaboliții pot fi fiziologic activi sau inactivi şi netoxici, mai puțin toxici sau mai toxic decât compusul de plecare. Cocaina ilustrează acest proces prin transformarea la norcocaină, care este fiziologic activă, în timp ce benzoilecgonina şi metilecgonina nu au nici o acțiune fiziologică. Astfel, toxicologul trebuie înțeleagă aceste reacții de biotransformare. În unele cazuri, metaboliții sunt singurele dovezi că un medicament sau o otravă a fost administrată. Dovezi ale consumului de heroină sau cocaină sunt date de prezența metaboliților respectivi, morfină şi benzoilecgonina.

Toxicologul trebuie să fie conştient de modificările chimice obişnuite care apar în timpul descompunerii unui corp. Autopsia sau analiza toxicologică ar trebui să fie începută cât mai curând posibil după moarte, înainte ca procesele naturale de descompunere să distrugă o otravă prezentă inițial la momentul morții ori să producă substanțe sau compuşi chimici cu

proprietăți fizice similare cu cele ale otrăvurilor frecvent întâlnite. De exemplu, în timpul descompunerii, fenilalanină, un aminoacid prezent în mod normal în organism, este transformat în feniletilamină, care are proprietăți chimice şi fizice foarte asemănătoare cu amfetamina. Conținutul de alcool etilic şi cianură din sânge poate fi scăzut sau crescut în funcție de gradul de putrefacție şi activitatea microbiană. Cu toate acestea, multe otrăvuri, cum ar fi arsenicul, barbituricele, mercurul şi stricnina, pot fi detectabile încă mulți ani după moarte.

Un caz neobişnuit de analiză post mortem a unei intoxicate cu heroină a arătat concentrații mari de morfină, codeină 6-monoacetylmorphine (6-MAM) şi cofeină (Joynt & Mikhael, 1985). Femeia înghițise mai multe prezervative cu o pulbere albă care sî-a golit conținutul lor în stomac după ce s-au spart, apoi scurgerile au ajuns în peritoneu printr-o ruptură in peretele stomacului. Concentrațiile sanguine au fost: morfină, 120 mg / L; codeina, 1,7 mg / L; şi cafeină, 400 mg / L.

Fenacetina este un analgezic utilizat cu precădere ca analgezic şi antipiretic. Un studiu epidemiologic a aratat că.folosirea excesivă, pe termen lung a fenacetinei este asociată cu creşterea riscului de cancer al tractului urinar. Efectul carcinogen al fenacetinei a fost observat şi în testele făcute pe animale. Fenacetina devine un metabolit mutagen prin hidroxilare la atomul de azot, cu formare de N-hidroxi-fenacetină ce produce cancer al tractului urinar.

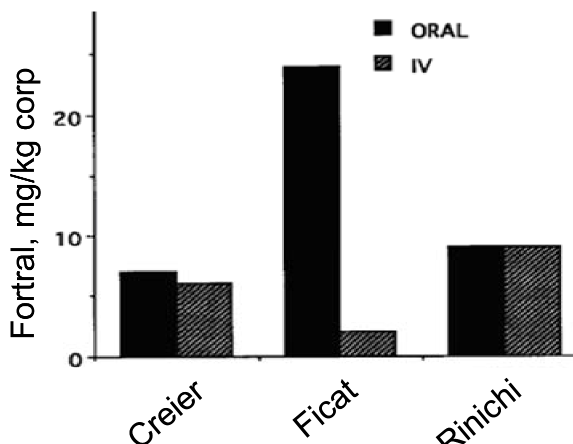


6. Interpretarea rezultatelor

Odată ce analiza probelor este finalizată, toxicologul trebuie să interpreteze concluziile asupra efectelor fiziologice ale substanțelor toxice găsite, în funcție de concentrația determinată şi

dacă acestea au putut provoca moartea victimei. Contează calea de administrare, indiferent dacă toxicul prezent este sau nu în concentrație suficientă pentru a provoca moartea sau modifica comportamentul victimei astfel încât să contribuie la moartea sa. Evaluarea rezultatelor analitice din punct de vedere fiziologic este de multe ori problema cea mai dificilă cu care se confruntă toxicologul criminalist.

La determinarea modului de administrare, toxicologul ia în considerare rezultatele analizei diferitelor probe. Ca regulă generală, cele mai mari concentrații de toxic vor fi găsite la locul faptei. Prin urmare, prezența unor cantități mari de droguri sau otrăvuri în tractul gastro-intestinal şi ficat indică administrarea orală, în timp ce concentrații mai mari în plămâni, în comparație cu alte organe viscerale indică inhalare. Concentrații mari de toxic în țesuturile din jurul unui loc de injectare vor indica efectuarea recentă a unei injecții intramusculare. Injectarea intravenoasă introduce un medicament sau drog direct în circulația sistemică, evitând astfel efectul inițial de concentrare în ficat. O examinare a concentrației relative a medicamentelor (Fortral) în mai multe țesuturi poate indica mai degrabă o injecție intravenoasă, decât o administrare pe cale orală (Figura x).



Distribuția medicamentului opioid Fortral în diferite organe.

Prezența unui material toxic în tractul gastro-intestinal, indiferent de cantitate, nu reprezintă o dovadă suficientă pentru a stabili dacă acest toxic este cauza decesului. Toxicologul trebuie să demonstreze că absorbția de toxicului a avut loc şi că a fost transportat prin intermediul circulației generale către organul în cauză, unde aceasta a avut un efect fatal. Acest lucru este stabilit prin analiza sângelui şi a țesuturilor. O excepție de la regulă este dată de substanțele chimice puternic corozive, care îşi exercită efectele nocive direct asupra țesuturilor, prin distrugerea acestora, provocând astfel hemoragie şi şoc. Exemple relevante ar fi acizii clorhidric şi sulfuric concentrați, leşia şi fenolul. Rezultatele analizei de urină sunt adesea nesemnificative în determinarea efectelor fiziologice ale unui agent toxic. În general, aceste rezultate stabilesc numai dacă înainte de colectarea probei toxicul a fost prezent în organism. Corelarea valorilor obținute în analiza urinei cu efectele fiziologice este nesemnificativă, din cauza diverşilor factori care influențează viteza de excreție a anumitor compuşi şi a volumului de urină.

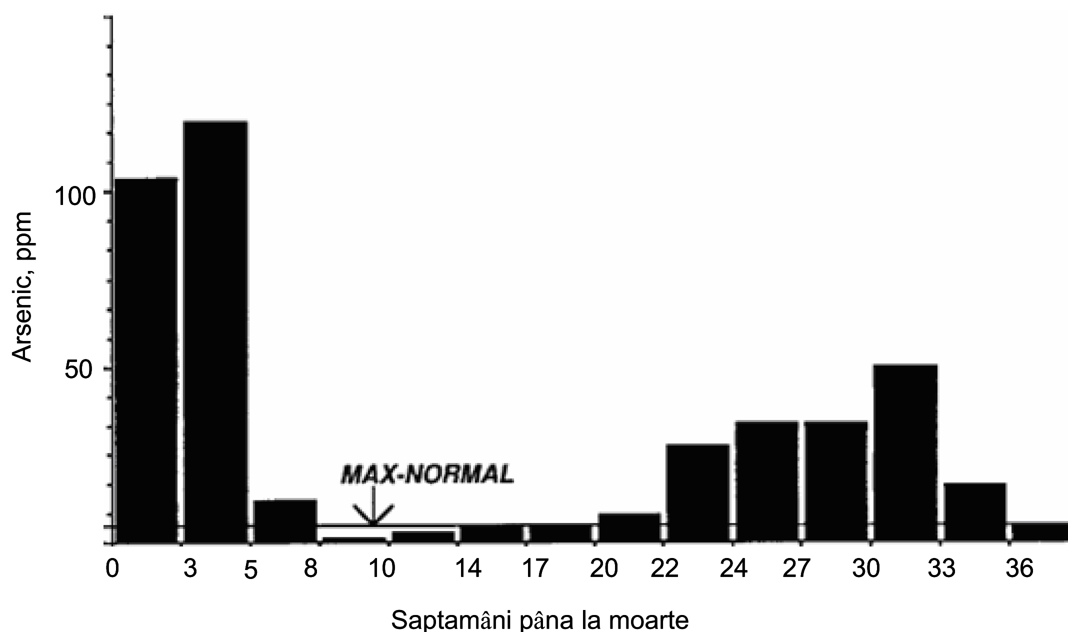
Efectele fiziologice ale celor mai multe droguri şi otrăvuri se corelează cu concentrația acestora în sânge şi stabilesc dacă absorbția a avut loc. Prin urmare, concentrațiile sanguine sunt adesea cei mai buni indicatori de toxicitate; în consecință, sângele este una din cele mai valoroase probe pentru toxicolog. Pentru a interpreta corect concentrațiile din sânge sau din țesuturi, toxicologul trebuie să ia în considerare toți factorii care influențează obținerea unei concentrații date a toxicului într-o probă. Interpretarea valorilor analizei sângelui sau țesutului poate fi împărțită în trei categorii: (1) normal sau terapeutic, (2) toxic şi (3) letal. O valoare normală este atunci când concentrația unei substanțe găsite la majoritatea populației şi care nu are niciun efect toxic asupra organismului. De exemplu, cianura este de obicei, uşor de identificat ca produs chimic extrem de otrăvitor, cu toate acestea, cantitățile neînsemnate de cianură sunt generate în urma ingestiei anumitor alimente. De asemenea, cantități mici de cianură sunt generate şi absorbite în timpul fumatului.

Prin urmare, cantități mici de cianură sunt prezente în mod normal în organism, iar concentrațiile scăzute sunt tolerate fără a fi toxice. Multe metale grele şi metaloide, cum ar fi plumbul, mercurul şi arsenul, care nu sunt esențiale pentru funcționarea normală a corpului, sunt prezente la majoritatea populației, datorită contaminării din mediu. O valoare terapeutică este acea concentrație a unui compus care produce efecte terapeutice - cantitatea de medicament necesară şi suficientă pentru a trata o afecțiune medicală, dar nu suficientă pentru a provoca toxicitate. O valoare toxică este acea concentrație a unui compus care este asociată cu efectele nocive, care pot pune sau nu viața în pericol. O valoare letală este acea concentrație a unui toxic care are ca efect sau reprezintă chiar cauza decesului şi este stabilită în mod constant drept cauza morții, în cazuri bine documentate şi investigate.

În anumite cazuri, toxicologul poate face diferența între o intoxicație acută şi o intoxicație cronică. De exemplu, părul este proba preferată pentru diagnosticul de expunere cronică la arsenic. Analiza secvențială a unor secțiuni de păr poate indica modelul de expunere la arsenic. Arsenicul care circulă prin sânge este depus în foliculul pilos, unde este prins de keratină şi transportat până în foliculul de păr în creştere. Celulele germinative ale părului sunt în echilibru relativ strâns cu arsenic circulant. Deoarece concentrațiile de arsenic din sânge cresc sau scad, la fel se întâmplă şi cu cantitatea de arsenic depus în firele de păr creştere. Părul creşte cu aproximativ 0.4 - 0.5 mm / zi sau 12,5 mm pe lună. Prin urmare, analiza unor segmente de 1.0 cm sau mai mici oferă un model lunar de expunere. Conținutul normal de arsenic de păr variază în funcție de factori nutriționali, de mediu şi fiziologici. Cu toate acestea, limita maximă la persoane care nu sunt expuse la arsenic este de aproximativ 5 ppm. Odată ce un individ este îndepărtat de sursa de expunere la arsenic, valorile acestuia în păr revin la normal în câteva săptămâni. Profilul arsenicului în părul victimei unei crime, prezentat în figura xx, indică otravirea cronică cu arsenic. Ucigaşul a pregătit mesele victimei din ultimele 2 luni din viața sa. Victima a fost în spital, din a treia până în a cincea lună înainte de moarte, iar cu ucigaşul înainte şi după această dată.

Factorii care pot influența răspunsul unui individ la o concentrație toxică dată sunt vârsta, sexul, greutatea corporală, maturitatea, starea de nutriție, aspectele genetice şi imunologice. De asemenea, existența unei boli sau afectarea unui anumit organ, dar şi activitatea sistemului nervos central (depresie, stres, etc) trebuie luate în considerare. Un

factor suplimentar care complică adesea interpretarea este fenomenul farmacologic de "toleranță". Toleranța este o stare de receptivitate scăzută la un toxic ca rezultat al expunerii înainte de aceasta, o perioadă lungă de timp, la un compus asemănător. Există o serie de mecanisme fiziologice pentru dezvoltarea toleranței. Adaptarea celulară este însă cea mai problematică pentru toxicolog.



Distribuția arsenicului în păr în caz de otrăvire criminală.

Adaptarea celulară este o formă de toleranță în care sunt necesare concentrații tot mai mari în sânge sau țesuturi dintr-un medicament pentru a obține răspunsul farmacologic dorit. De pildă, persoanele dependente de narcotice pot lua în mod regulat doze de metadonă, care pentru ei nu producă deprimarea sistemului nervos central, în timp ce aceeaşi doză, poate provoca moartea cuiva care nu primeşte în mod regulat opiacee. Factorii care influențează concentrația din sânge sau țesut dat după administrarea unui toxic sunt legați atât de natura compusului, cât şi de structura biologică a individului. Compoziția chimică şi caracteristicile fizice ale unui material modifică adesea toxicitatea sa. De exemplu, sărurile sau clorhidrații anumitor metale sunt mult mai solubile în tractul gastro-intestinal şi, prin urmare, absorbite mai rapid decât sulfurile lor. În general, cu cât se absoarbe mai repede un compus, cu atât este mai mare concentrația sa în sânge. Preparatele farmaceutice pot fi formulate în aşa fel încât, în urma ingestiei orale, medicamentul să fie absorbit fie rapid fie extrem de lent. Factorii biologici ce afectează în primul rând concentrația în sânge a unui toxic sunt legarea sa de proteinele din țesuturi şi viteza sa de biotransformare. Viteza de biotransformare a unei substanțe este controlată genetic şi este adesea supusă unor variații individuale semnificative. În cazul în care mai multe persoane primesc aceeaşi doză de drog sau medicament raportată la greutatea corporală, concentrația acestuia în sânge poate varia foarte mult de la o persoană la

alta din cauza diferențelor dintre vitezele lor de biotransformare a respectivelor substanțe. De pildă, Rasputin a fost otrăvit cu cianură de potasiu, însă a rezistat dozei administrate în cafea. Ucigaşii săi au recurs la împuşcarea acestuia. Datorită sănătații sale excepționale au fost necesare mai multe gloanțe pentru a-l răpune. In ceea ce priveşte cianura utilizată, unii toxicologi consideră că administrarea sa în cafea ar fi determinat o reacție a ionului cian cu gruparea carbonil din molecula zahărului, cu formarea unei cianhidrine mai puțin toxice.

Toxicii sunt eliminați din organism pe diferite căi. Gazele, cum ar fi monoxidul de carbon, sunt eliminate prin plămâni o dată cu aerul expirat. Altele, cum ar fi metalele toxice, DDT şi morfina, sunt eliminate în principal prin bilă şi, apoi, fecale. Cu toate că acestea sunt cele mai importante căi de excreție, multe otrăvuri sunt eliminate în toate secrețiile organismului (transpirație, lapte şi lacrimi). Calea principală de îndepărtare a celor mai mulți toxici este eliminarea prin urină. Viteza de eliminare a toxicilor prin urină afectează foarte mult cantitatea prezentă în sânge sau țesuturi la un moment dat. Cu toate acestea, excreția urinară este foarte variabil şi depinde de volumul şi aciditatea urinei.

Teoretic, prin schimbarea acidității urinii cu numai o unitate de pH, este posibil să se producă o modificare de zece ori a vitezei de eliminare a medicamentelor slab acide sau alcaline. Numai după trecerea în revistă a istoricului de caz, luând în considerare toți factorii de toxicitate mai sus menționați, precum şi distribuția şi biotransformarea şi compararea rezultatelor analitice cu cazuri similare raportate în literatura de specialitate sau în cazuri similare din propria sa experiență, toxicologul poate trece la interpretarea finală a unui caz.

7. Laboratoarele de medicină legală

Laboratoarele de medicină legală sau criminalistice se ocupă cu examinarea dovezilor de la locul faptei (care sunt legate de crimă, victime şi suspecți). Constatările științifice de laborator sunt coroborate cu alte devezi pentru pregătirea urmăririi penale şi realizarea procedurilor juridice sau a procesului penal. Progresele în tehnologia științifică a condus la realizarea laboratoarelor de criminalistică moderne ce necesită cunoştințe în domeniile științei naturale cum ar fi biologia, chimia, fizica, şi matematica. Angajarea în aceste laboratoare necesită, de obicei, o diplomă în una sau mai multe din aceste domenii de activitate. Multe persoane cu masterat şi doctorat sunt serologi, toxicologi şi specialişti în microscopie. A crescut numărul de colegii şi universități care acordă grade universitare şi postuniversitare în domeniul criminalisticii, inclusiv în toxicologia medico-legală. Laboratoarele de criminalistică oferă o carieră interesantă şi plină de realizări în domeniul științei criminalistice unui absolvent de facultate specializat în una sau mai multe științe naturale.

Dovezi fizice examinate în laboratoare pot fi utilizate în cadrul anchetelor criminalistice în următoarele domenii semnificative, cum ar fi 1) definirea elementului crimei (aduce dovada că o infracțiune a fost comisă, cum ar fi identificarea şi cuantificare a unui medicament sau substanță controlată sau determinarea cantității de alcool în sânge a unei persoane suspectate de conducere în stare de ebrietate); 2) furnizarea căilor de investigație pentru realizarea unui caz (exemplu, identificarea unei substanțe în urina unei victime violată şi care a fost drogată cu γ-hidroxibutirat); 3) legarea de scena crimei a suspectului sau victimei (studiul dovezilor fizice, cum ar fi de păr, sânge, spermă şi amprentele digitale); 4)

infirmarea unui alibi sau a unei declarații prin studiul probelor care diferențiază o sinucidere de o crimă (declarația ucigaşului poate fi contrazisă de reproducerea unor elemente din actul crimei în laborator); 5) identificarea suspectului, prin compararea amprentelor sau profilare ADN-ului şi nu numai; 6) inducerea declarației de mărturisire a suspectului (cum ar fi identificarea otrăvii în casa ucigaşului şi a victimei, dovada de cumpărare sau procurare a otrăvii); 7) exonerarea unui nevinovat (dacă nu se găsesc fluidele sale la locul faptei).

Laboratoarele de medicină legală sau de criminalistică variază în dimensiune şi dotare. In SUA, de pildă, funcționează laboratoarele de medicină legală în diferite regiuni ale țării cu specialități diferite. Laborator FBI, în Washington, DC, este cel mai recunoscut laborator de acest gen. Drug Enforcement Administration (DEA) are laboratoare pentru analiza drogurilor şi medicamentelor ilicite, iar Biroul ATF (alcool, tutun, arme de foc) ajută anchetele penale care implică incendii şi explozii, precum şi cele legate de arme de foc, alcool şi tutun. Armata SUA dispune de un laborator de criminalistică în Georgia, precum şi altele în Frankfurt, Germania şi Japonia. Multe agenții implicate în aplicarea legii se bazează pe laboratoare similare la nivel local sau de stat. Birourile medicilor legişti au, de obicei, anexe cu instalații de laborator.

7.1 Secțiuni tipice ale laboratorului criminalistic

Laboratoarele de medicină legală oferă servicii multidisciplinare care sunt împărțite în secțiuni bazate pe tipurile de probe fizice examinate. Unele dintre secțiuni au nevoie de echipamente specializate şi instrumente sau instruirea personalului, în timp ce alte secțiuni pot avea instrumente în comun. Criminaliştii se pot roti pe secțiunile laboratorului în funcție de formarea lor, experiență şi calificare. În funcție de mărimea şi volumul de muncă al unei secțiuni anumite, unele dintre secțiuni pot fi combinate sau subdivizate.

Forensic laboratories are also maintained at colleges and universities, as well as in the private sector. Forensic laboratories may be full service or specialize in one or more areas. For example, the FBI laboratory and most state laboratories are considered full-service operations, whereas many medical examiner's office laboratories concentrate on forensic toxicology or the analysis of body tissues and fluids for drugs, poisons, and other toxic substances. Private forensic laboratories such as National Medical Services, Inc., in Willow Grove, Pennsylvania, offer services in forensic toxicology and criminalistics. Some of the private forensic laboratories are completely specialized in an area of forensic science. The McCrone Research Institute in Chicago, Illinois, performs microscopic analysis of particulate matter, and Cellmark Diagnostics in Germantown, Maryland, provides DNA analysis of blood and other body materials. Whether the forensic or crime laboratory exists in the public or private sector, it should demonstrate a high level of quality control and reproducibility of results through participation in blind testing of samples. Laboratory certification or accreditation is available through organizations such as the Association of Crime Laboratory Directors (ACLD).

Laboratoarele medico-legale sunt, de asemenea, menținute la colegii şi universități, precum şi în sectorul privat. Laboratoarele de medicină legală poate fi full service sau se specializeze în una sau mai multe zone. De exemplu, laboratorul FBI şi cele mai multe laboratoare de stat sunt considerate operațiuni de full-service, în timp ce multe laboratoare examinator medical de birou se concentreze asupra toxicologiei medico-legale sau analiza tesuturile organismului si fluide pentru droguri, otrăvuri, şi alte substanțe toxice. Privat

laboratoarele medico-legale, cum ar fi National servicii medicale, Inc, în Willow Grove, Pennsylvania, ofera servicii în toxicologie medico-legală şi criminalistică. Unele dintre laboratoare private de specialitate medico-legale sunt complet într-un domeniu al ştiinței criminalistice. McCrone Institutul de Cercetare în Chicago, Illinois, efectuează analiza microscopică de pulberi în suspensie, şi Cellmark Diagnostics în Germantown, Maryland, oferă o analiză ADN a sângelui şi a altor materiale corpului. Dacă criminalistice de laborator sau crimă există în sectorul public sau privat, ar trebui să demonstreze un nivel ridicat de control al calității şi reproductibilitatea rezultatelor prin participarea la testarea orb de probe. Laborator de certificare sau acreditare este disponibil prin intermediul unor organizații precum Asociația de Crime Directorilor de laborator (ACLD).

7.2 Toxicologie şi identificarea drogurilor

Secția de laborator destinată toxicologiei şi identificării drogurilor utilizează tehnici moderne de chimie criminalistică şi de instrumentale pentru a izola, a identifica, de multe ori a cuantifica alcoolul, drogurile, otrăvurile şi alte materiale toxice. Materialele prezentate pentru analiză pot consta din cantități mari de droguri ilicite cum ar fi marijuana, heroina, LSD, cocaină care trebuie să fie cântărite cu precizie, analizate şi de multe ori quantificate pentru a se stabili gradul de abatere de la lege. Alte materiale lichide, solide sau gazoase pot fi trimise pentru analiză pentru a determina prezența oricărui element toxic sau otrăvitor. Multe laboratoare de criminalistică analizează sânge pentru alcool şi / sau conținut de droguri. In cazurile de conducere în stare de ebrietate sau sub influența unor droguri sau medicamente, din care a rezultat moartea respectivei persoane, se efectuează determinarea alcoolului şi drogurilor din țesuturile organismului şi fluidelor sale pentru determinarea cauzei de deces în legătură cu medicul legist.

7.3 Serologia

Serologia medico-legală se ocupă cu analiza, identificarea şi individualizarea fluidelor şi țesuturilor corporale, secrețiilor şi excrețiilor. Sângele, sperma, saliva sunt tipurile cele mai frecvent întâlnite de probe, dar ocazional probe cum ar fi transpirația, urina, conținutul gastric, şi fecalele pot fi examinate în scop de caracterizare. Dovezi fizice de acest tip sunt, de obicei, trimise la laborator în formă de pete uscate pe haine sau alte materiale recuperate de la locul faptei, de la victimă sau suspect. Eşantioanele de control formate din zone curate de pe suprafața din care au fost obținute petele suspecte trebuie să fie incluse în analize. Probele standard cunoscute constând din sângele victimei şi / sau suspectului sunt, de asemenea, utilizate în scopuri comparative.

7.4 Materialele examinate de toxicologul criminalist

7.4.1 Colectarea probelor

Calitatea de probelor fizice depinde de buna observare, documentare, de colectare, conservarea, ambalarea acestora la locul crimei, precum şi a celor ce provin de la victimă şi suspect. Acest lucru solicită calificare şi meticulozitate de la anchetatori şi patologi la locul crimei, precum şi utilizarea metodelor ştiințifice sofisticate în laborator. Acest lucru este

realizat prin instruirea corespunzătoare şi experienţă de anchetatori scena crimei şi patologi medico-legale, precum şi oameni de ştiinţă medico-legală sau criminalişti angajate în domeniul examinării ştiinţifice a probelor fizice în laborator.

Este necesar să se cunoască poziţia probelor fizice de la scena crimei înainte de colectare şi de ambalare. Aceasta se realizează de obicei prin fotografie, note scrise şi diagrame. Colectarea probelor fizice impune o atenţie deosebită asupra tipului de dovezi întâlnite şi ambalarea lor corespunzătoare. Dovezile nu trebuie să se modifice, denatureze sau să fie contaminate înainte de analiză. Elementele colectate trebuie marcate cu un număr secvenţial, în funcţie de locul unde au fost descoperite, notând ora şi data şi parafarea acestor informaţii de către persoana care a colectat probele. Materiale cu risc biologic, cum ar fi sângele şi fluidele corpului, ar trebui plasate în containere marcate în mod clar. Laboratoarele criminalistice au protocoale de colectare a probelor şi ambalare care trebuie respectate cu stricteţe. De exemplu, materialele pătate de sânge, cum ar fi hainele sau lenjeria de pat ar trebui să fie bine uscate la aer, înainte de ambalare. Aceasta evită activitatea bacteriană care ar putea împiedica analizele ulterioare. Sunt necesare containere speciale pentru colectarea de particulele sub formă de urmă, din probă, pentru a evita pierderea şi contaminarea. O bună comunicare între laborator şi tehnicienii de la scena crimei este esenţial ca să se asigure că procedurile corespunzătoare sunt respectate.

7.4.2 Tipuri de dovezi fizice

Dovezile fizice pot exista în aproape orice formă sau dimensiune, în funcţie de natura şi mediul înconjurător al evenimentului penal. Acesta poate exista la locul crimei sau a fost transferată între victimă şi agresor, precum şi în orice alt loc, în funcţie de activităţile persoanelor implicate. Examinarea şi analiza probelor fizice de către criminalist presupune identificarea fizică sau chimică a materialelor cu cel mai înalt grad de certitudine ştiinţifică posibilă cu tehnologia actuală. De exemplu, identificarea şi determinarea cantităţii de substanţă prezentă în probe reprezintă obiective ale analizei alcoolului şi drogurilor ilicite. Se stabilesc elementele infracţiunii în cazurile de conducere a automobilului în stare de ebrietate sau în cele care implică deţinerea sau vânzarea de substanţe cu regim special.

Uneori se compară probe extrem de diferite între ele pentru a se realiza contextul unei infracţiuni sau crime. Astfel, de pildă, tabloul unui jaf în care un grup de indivizi au lovit un paznic de noapte şi au sustras apoi cereale dintr-o magazie poate fi redat atât de declaraţia respectivului paznic, de urmele lăsate de infractori pe teren, de analiza cromatografică a seminţelor de cereale pentru a stabili dacă cele sustrase sunt identice cu cele din magazie, etc. O astfel de comparaţie implică potrivire fizică fragmentelor de obiecte găsite la faţa locului sau în curtea infractorilor, stabilirea tipului de autoturism implicat, existenţa urmelor de sticlă sau haine, toate sub forma unui joc puzzle. Unele probe sub formă de urmă, cum ar fi firele de păr şi fibrele, necesită un studiu comparativ microscopic. Un exemplu de suficienţă în actul de justiţie îl constituie „rezolvarea” unui caz numai pe baza mărturiei făptuitorului. Este o greşeală imensă această atitudine, deoarece un individ poate lua asupra sa fapta altei persoane (soţ-soţie, mamă-fiu, etc.), iar alte persoane pot fi obligate la mărturie mincinoasă. De aceea, refacerea întregului tablou pe bază de dovezi ştiinţifice poate conduce la un act de justiţie

corect. Criminalistul poate să prezinte şi probabilitatea că dovada adusă de el este corectă şi incriminează infractorul sau criminalul. Astfel, analiza ADN-ului conduce la o identificare a suspectului cu o probabilitate mai mare de 99,99%.

8. Tipurilor comune de dovezi fizice

Fluidele din organism, cum ar fi sângele, sperma, saliva, sub formă lichidă sau uscată sunt adesea prezente pe țesături, haine sau alte obiecte. Aceste materiale biologice sunt frecvent colectate pe cârpe sau tampoane sterile de la locul crimei sau de la persoanele implicate pentru identificări prin tehnici serologice sau profil ADN. Identificarea unor tipuri de sânge la locul unei crime violente şi pe hainele victimelor şi suspecților permite lămurirea evenimentului. Alte excreții ale corpului, cum ar fi urina, transpirația şi fecalele pot fi identificate în diferite pete sau materiale.

Identificarea de sânge sau material seminal pe uscat, materiale colorate şi individualizare ulterioare, precum şi față de persoanele cunoscute pentru includerea sau excluderea sunt funcțiile majore ale serologist. Se procedează la identificarea sângelui cu un test chimic ce utilizează anumite metale şi peroxidaze de plante pentru a indica posibila prezență de sânge. Alte teste pentru sânge includ fenolftaleina, care produce o culoare luminoasă de culoare roz, în prezența sângelui şi verde leucomalachite, care produce o culoare albastru-verde în prezența acestuia. Luminolul este un alt tip de test prezumtiv pentru sânge, care este frecvent utilizat la locul crimei pentru a localiza urmele de sânge în zonele care au fost spălate sau de sânge nu este altfel vizibil cu ochiul liber. În aceste cazuri, luminolul se pulverizează pe suprafețele cu posibile urme de sânge şi se observă în întuneric o luminiscență chimică alb-albastruie care poate indica prezența sângelui.

Acest tip de luminescență poate fi fotografiată pentru a fi inclusă ca dovadă în actul de justiție. Daca testul este negativ, se consideră că sângele nu este prezent în eşantion. Dacă testele sunt pozitive, se trece la confirmare şi identificarea speciilor (origine umană şi animală). Acest lucru este realizat cu anticorpi specifici, care vor reacționa cu materialul suspect. Proceduri serologice convenționale pentru individualizarea sângelui, precum şi a materialului seminal includ caracterizarea proteinelor polimorfe şi a markerilor genetici. Aceste proceduri sunt mai rar utilizate de când cu apariția tehnicilor ADN.

Țesuturile organismului pot fi prelevate pentru analize toxicologice din organele recoltate la autopsie, împreună cu sânge, urină şi conținutul stomacal.

Drogurile şi substanțele cu regim special sunt recoltate sau confiscate pentru identificare şi cântărire; acestea pot fi materii prime vegetale, pulberi, tablete, capsule sau alte preparate.



Unele dintre capsulele şi tabletele confiscate conțin LSD (dietilamida acidului lisergic.

Materialele explozive şi lichidele inflamabile, materialul solid sau resturile arse pentru identificarea de accelerants şi reziduuri explozive sunt de interes criminalistic general, mai puțin interesând toxicologul. Acelaşi lucru se poate afirma despre armele de foc, proiectilele sau gloanțele găsite la locul unei crime, etc. Se pot colecta probe de sticlă, acestea putând fi importante pentru înțelegerea direcției unui glonte. Pentru toxicolog însă pot fi interesante firele de păr colectate de la scena crimei, victimă sau suspect pentru determinarea identificarea speciilor (animale sau umane), rasă, şi partea corpului de origine. Dacă este uman, caracteristicile morfologice ale părul pot fi utilizate pentru a include sau exclude un suspect. De asemenea, este posibil să se determine dacă părul a fost zdrobit, tăiat, ars, scos cu forța sau căzut în mod natural. In firul de păr pot fi identificate metalele grele, arsenul etc. Dacă numărul firelor este foarte mic, atunci determinările toxicologice sunt mai dificil de realizat.

Uleiurile şi produsele cosmetice transportate de la obiecte la persoane fizice posedă compoziții unice ce pot fi folosite pentru comparație şi identificare. Toxicologul poate utiliza astfel de date pentru precizarea persoanei la care s-au descoperit droguri sau otrăvuri.

Solurile şi mineralele, lemnul, vegetația şi altele pot permite identificarea şi stabilirea sursei sau locației posibile care poate fi asociată cu un suspect sau victimă.

9. Analiza de urme

Principalul instrument pentru analiza urmelor este microscopul. Un stereo microscop de putere medie care măreşte, de obicei, în intervalul × 40-50 este utilizat pentru scanarea şi sortarea multe tipuri de dovezi fizice, cum ar fi hainele şi pentru colectarea de urme materiale. Microscopul cu mărire de până la × 1000 este utilizat pentru analiza şi compararea firelor de păr, fibreloe, solului, produselor cosmetice, particulelor de praf şi de reziduuri, precum şi o gamă largă de pulberi în suspensie. Un microscop cu lumină polarizată este utilizat pentru observarea proprietăților optice şi morfologia materialelor. Un microscop de comparație este utilizat pentru vizualizarea side-by-side a probelor, cel mai frecvent firele de păr şi fibre. Acesta reprezintă de fapt două microscoape conectate printr-o prismă cunoscută ca punte de comparație. Acest lucru permite împărțirea câmpului vizual al fiecărui microscop într-un semicerc, astfel încât cele două eşantioane pot fi vizualizate simultan.

Analiza de urme a probelor poate permite identificarea vopselelor, sticlelor, uleiurilor şi o serie de compuşi organici folosind teste microchimice şi instrumentale. Exemple de instrumente utilizate în acest sens sunt GC-MS şi tehnicile de analiză organică elementară, inclusiv IR, difractie de raze X şi fluorescență, spectrofotofluorometrie şi microscopie electronica de baleiaj (SEM). Microscopul electronic de baleiaj cu o rezoluție bună şi mărire de până la × 100.000 este, de asemenea, utilizat pentru examinarea probelor de particule din împuşcare, recuperate din mâinile persoanelor suspectate de folosire recentă a unei arme sau de a se fi aflat în imediata apropiere a descărcării unei arme de foc.

Bibliografie selectivă

1. Poklis, A. Forensic toxicology. In *Introduction to forensic sciences*. 2nd Ed., (W. G. Eckert,Editor) CRC Press, Boca Raton New York London Tokyo, 1997, pp. 116-141.
2. Cravey, R. H., Baselt, R. C. *Introduction to Forensic Toxicology.* Biomedical Publications, Davis, CA, 1981.
3. Ellenhorn, M. J., Barcelous, D. G. *Medical toxicology, diagnosis and treatment of human poisonin.,* Elsevier Science Publishing, New York, 1988.
4. Eckert, W. G., James, S. H. The role of the forensic laboratory. In *Introduction to forensic sciences*. 2nd Ed., (W. G. Eckert, Editor) CRC Press, Boca Raton New York London Tokyo, 1997, pp. 43-65.
5. R. C. Baselt and R. H. Cravey, *Disposition of toxic drugs and chemicals in man.* Yearbook Medical Publishers, 3rd ed., Chicago, IL, 1990.
6. *Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material.* 2nd ed., A. C. Moffat, Senior Ed., Pharmaceutical Press, London, England, 1986.
7. Curry, A. S. *Poison Detection In Human Organs,* 4th ed., Charles Thomas Publisher, Springfield, IL, 1988.
8. Joynt, B. P., Mikhael, N. Z. Sudden death of a heroin body packer. *J. Anal. Toxicol.*, 9, 238-240, 1985.

Elemente de
Toxicologie Medico-Legală

Cap. II. Analiza toxicologică. Tehnici şi strategii de sampling a probelor judiciare. Analiza fizico-chimică. Metode de analiză în toxicologie. Electroforeza. Cromatografia în strat subţire. Cromatografia de lichide de înaltă performanţă. Cromatografia de gaze. Spectroscopia. Tehnici imunologice. Aplicaţii.

Analiza toxicologică

În investigarea unei otrăviri, pentru toxicolog este necesară mai întâi izolarea şi identificarea otrăvii. Prin urmare, toxicologii criminalişti clasifică otrăvurile pe grupe, în funcţie de metoda utilizată pentru a izola substanţele din ţesuturile sau fluidele corpului.

Înainte de a începe analiza, toxicologul trebuie să ia în considerare mai mulţi factori: cantitatea de probă disponibilă, natura otrăvii căutate şi posibila biotransformare a otrăvii. Pentru că lucrează cu o cantitate limitată de probă, toxicologul trebuie să elaboreze o metodă analitică, ce va permite detectarea număr cât mai mare de compuşi.

Testul de culoare

Un test de culoare este o procedură chimică în care substanţa de testat reacţionează cu un reactiv care produce o schimbare acestuia, producând astfel o culoare observabilă sau schimbarea culorii. Testele de culoare pot fi folosite pentru a determina prezenţa anumitor compuşi sau a unei clase generale de compuşi. Procedurile sunt, de obicei, rapide şi uşor de realizat. Cel mai folositor dintre testele de culoare în toxicologie este depistarea rapidă a probelor de urină, deoarece urina poate fi analizat în mod direct, fără proceduri de extracţie consumatoare de timp. Un exemplu de test de culoare este "testul lui Trinder " pentru detectarea salicilaţilor în sânge sau urină. Un reactiv de azotat de fier şi clorură de mercur se amestecă cu 1 ml de sânge sau urină; în cazul în care sunt prezenţi salicilaţii se observă o culoare violet.

Ca şi în toate celelalte teste toxicologice, prezenţa de salicilaţi trebuie să fie confirmată şi de o altă metodă de analiză. Se observă un test Trinder pozitiv pentru acidul salicilic (un metabolit al aspirinei), salicilamidei şi salicilatului de metil. Un test fals-pozitiv, care conduce la obţinerea unei culori atunci când nu este prezent salicilatul, poate fi observat la urina pacienţilor cu diabet zaharat excreting acid acetoacetic şi la pacienţii trataţi cu doze mari de medicamente terapeutice fenotiazinice. toxicolog trebuie să fie conştienţi de limitările de el efectuează teste şi, în special sursele de reacţii fals-pozitive.

Testul de microdifuziune

Analiza microdifuziune este utilizat pentru izolarea rapidă şi detectarea de otrăvuri volatile.

Un aparat simplu microdifuziune constă dintr-un vas de porțelan mic cu două compartimente separate, un interior bine inconjurat de un exterior bine formate între periferie a peretelui de compartimentul interior şi peretele superior din afara vasului. bine exterior este celula proba, la care o cantitate mică, 1-5 ml, de sânge, urină, țesut sau omogenatul se adaugă. Pentru interior si un "absorbant", se adaugă. absorbant este un reactiv sau solvent, în special substanțe volatile care se va dizolva imediat. După eşantion şi absorbant se adaugă la celula corespunzătoare, vasul este sigilat cu un material izolant vâscoase şi acoperă cu o placă de sticlă rodată. Daca este permis să stea la temperatura camerei sau usor incalzite, otrava volatile va difuza din eşantion în atmosferă a vasului şi să fie prinse de soluția absorbant, care adesea este un reactiv de culoare.

Pe măsură ce otrava este eliberată din eşantion, toxicologul poate observa formarea unei coloraţii sau schimbarea culorii din vasul din interior absorbant. Numeroase otrăvuri volatile şi gaze pot fi detectate prin tehnici de microdifuzie; acestea includ acetaldehidă, monoxid de carbon, cianură etanol, fluor, hidrocarburi halogenate şi metanol.

Cromatografia

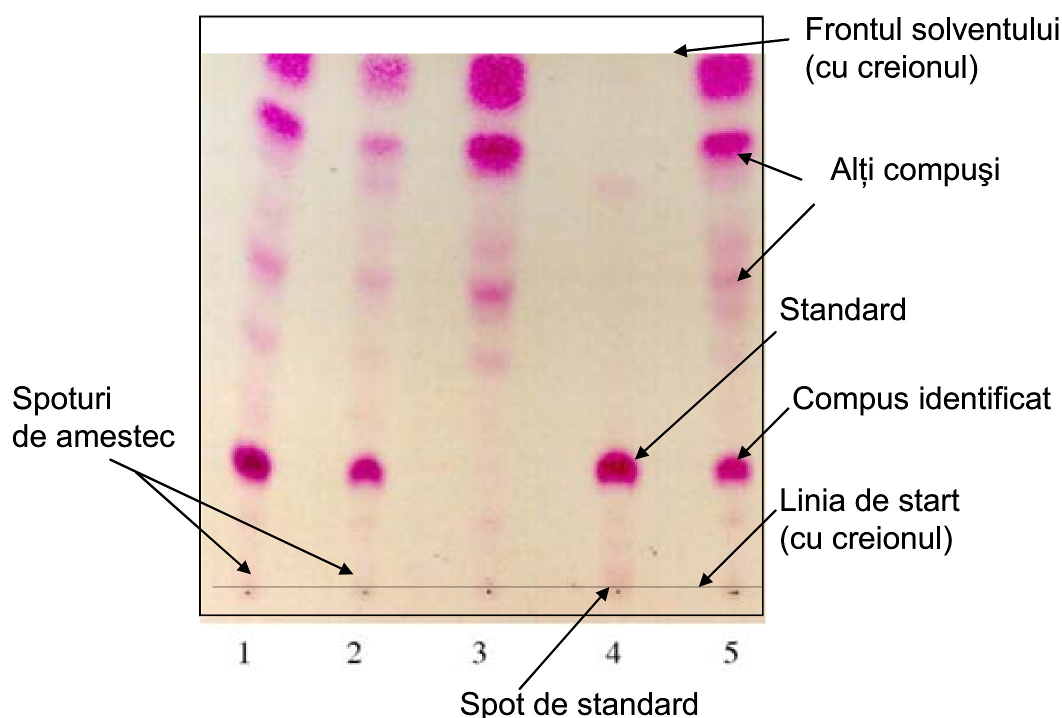
Cromatografia este o tehnica de separare. componente ale unui amestec de probă sunt distribuite între două faze, dintre care una este staționară în timp ce a doua, faza mobilă, percolează printr-o matrice sau pe suprafața fazei fixe. Componentele unui amestec prezintă diferite grade de afinitate pentru fiecare fază, iar când acestea sunt transportate de faza mobilă, are loc o migrare diferențiată. Unele componente sunt reținute pe faza staționară mai mult decât altele, producându-se o separare a compuşilor din acel amestec.

Reținerea unei componente de către faza staționară depinde de mai mulți factori, inclusiv natura chimică şi fizică a fazelor fixe şi mobile, precum şi de condițiile experimentale, cum ar fi temperatura sau presiunea. De aceea, substanțele folosite drept standarde de referință se cromatografiază în aceleaşi condiții ca substanțele necunoscute. Aceşti compuşi sunt identificați provizoriu prin compararea factorului lor de retenție în fază staționară cu acela al standardelor de referință. În continuare, după cromatografie, identitatea compuşii respectivi trebuie identificați şi prin alte metode de analiză, cum ar fi spectrometria de masă. Din multele tipuri de analize cromatografice, trei sunt mai frecvent aplicate de toxicologi. Acestea sunt cromatografia în strat subțire (TLC), cromatografie de gaz-lichid (GLC) şi cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC).

Cromatografie în strat subțire.

În TLC, faza staționară este un "strat subțire" a unui gel absorbant, de obicei silice (bioxid de siliciu), care se intinde pe un suport solid, cum ar fi o placă de sticlă. Extractele concentrate din probele prelevate, împreună cu mostrele (standardele) de droguri sunt aplicate sub formă de serie de puncte de-a lungul parții de jos a plăcii cromatografice şi lăsate să se usuce. Placa este apoi plasată într-un vas cromatografic închis (de formă paralelipipedică), în care stratul absorbant de silicagel sau oxid de aluminiu de pe sticlă intră în contact cu faza mobilă (soluția de developare) sub punctele de substanțe aplicate.

Pentru identificarea unei substanțe se folosește un standard, adică substanța căutată, de exemplu un drog (heroină, LSD, cocaină) sau un medicament, care se spotează pe linia de start (de exemplu în poziția 4 din figura de mai jos). Proba de analizat (de pildă urină, extract din firul de păr, etc) se spotează în celelalte poziții pe linia de start. După migrarea solventului, care poate fi o soluție ce conține solvenți diferiți (apă: alcool butilic: acid acetic; apă: acetonă: amoniac, etc.) pe placă până în apropierea marginii de sus a plăcii de silicagel depus pe aluminiu, se trasează cu creionul, ca şi în cazul liniei de start, locul unde a ajuns solventul (frontul solventului, Fs). Se usucă placa la aer sau prin suflare cu aer cald de la un uscător de păr, se developează substanțele de pe placă cu un reactiv potrivit, se usucă din nou pentru a obține pete stabile şi se măsoară factorul de retenție, Rf. Se pot vizualiza substanțele de pe placă prin iluminarea acesteia cu lumină ultravioletă, dacă placa are adăugată o substanță fluorescentă. In acest caz se marchează substanțele cu un creion. Rf este de regulă o caracteristică a unei substanțe într-un amestec de developare anumit. Totuşi, este bine să se introducă şi un standard. Rf se calculează astfel: se împarte distanța parcursă de o anumită substanță de la linia de start la distanța parcursă de frontul solventului de la linia de start.



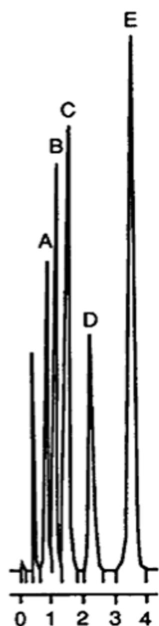
Tehnica TLC: Placă din aluminiu cu silicagel pe care migrează diverse substanțe ce sunt identificate apoi prin Rf (factorul de retenție).

De exemplu, în extractele de urină pentru depistarea drogurilor, toxicologul spray-iază cromatograma cu ninhidrină care produce o culoare roşie sau roz cu amine primare, cum ar fi amfetamină sau efedrină. Apoi, el poate aplica etanol în acid sulfuric, care produce o serie de pete viu colorate în roz, portocaliu, albastru sau verzi dacă sunt prezente tranchilizante fenotiazinice şi metaboliți ai acestora. Placa poate fi în continuare pulverizată cu iodoplatinat, care reacționează cu toate baze azotate.

Există numeroşi reactivi pentru TLC, dar toxicologul trebuie să fie ghidat de natura chimică a compuşilor pe care doreşte să-i identifice. În cazul în care un compus din extract migrează la aceeaşi distanţă şi reacţionează la spray-urile aplicate în acelaşi mod ca drogul de referinţă, toxicologul va încerca identificarea compusului printr-un alt test chimic.

Cromatografia de gaz-lichid

În GLC, faza mobilă este un gaz purtător inert (de exemplu, heliu, azot), care curge printr-o coloană umplută cu un suport solid acoperit cu fază lichidă staţionară sau peste un strat lichid aflat pe pereţii coloanelor capilare înguste. Mai multe tipuri de materiale lichide sunt folosite în această tehnică şi se folosesc în funcţie de natura compuşi sau grupe de compuşi care trebuie separaţi şi identificaţi. Probele extrase sunt vaporizat şi transporatate de gaz prin coloană. Deoarece compuşii sunt eluaţi de pe coloană, aceştia sunt transportaţi de gaz la un detector, care produce un semnal electric care este amplificat şi afisşat pe un înregistrator. Migrarea unui compus prin coloană este exprimat prin timpul de retenţie (Rt), care este definit ca intervalul de timp scurs între injectarea probei şi detectarea compusului. Timpul de retenţie oferă o încercare de identificare a compusului, iar intensitatea semnalui la înregistrator poate fi folosită pentru determinarea cantitativă a compusului prezent în probă. Un compus de referinţă se cromatografiază în aceleaşi condiţii ca şi compuşii căutaţi, care produce un semnal (vârf, peak) la acelaşi timp. Înălţimea semnalului şi aria dsa sunt direct proporţionale cu concentraţia drogurilor prezente Cromatografia de gaz este deosebit de adecvată pentru analiza substanţelor volatile, cum ar fi alcoolii.



Cromatograma de gaz a unui amestec de alcooli:
A – Metanol; B – Acetonă; C – Etanol; D – Izopropanol; E – Butanol.

Cromatografia de lichid de înaltă performanţă

În HPLC, faza mobilă este un lichid care curge printr-o coloană umplută cu faza staţionară solidă, sub presiune continuă. Sunt folosite umeroase tipuri de materiale staţionare, iar

toxicologul poate folosi aproape orice fel de amestecuri de solvenți sau numeroase amestecuri apoase ca faza lichidă. Se pot imagina proceduri specifice pentru separarea compuşilor care nu sunt uşor de separat prin alte metode cromatografice. Metoda este adecvată în special pentru compuşii sensibili la căldură, care se pot descompune atunci când se volatilizează în GLC. Ca şi în cazul GLC, medicamente eluate sunt identificate prin Rt lor, iar semnalele la detector sunt proporționale cu concentrația de droguri prezente în eşantion.

Spectroscopia

Spectroscopia se referă la absorbția sau producerea de energie radiantă. Absorbția radiației este o caracteristică a tuturor moleculelor, cu toate acestea, dar lungimea de undă a radiației absorbite poate varia de la raze X prin ultraviolete, vizibile şi infra-roşu până la frecvențele microundelor şi undelor radio. Interacțiunea unui compus chimic cu radiația depinde de structura moleculară şi lungimea de undă a radiației. Absorbția radiației de către un compus în raport cu lungimea de undă a radiației reprezintă un spectru de absorbție şi este o caracteristică a compusului. Specificitatea spectrului este legată de regiunea de absorbție. De exemplu, numeroşi compuşi chimici au spectre în ultraviolet identice (200-350 nm), în timp ce spectrul de infra-roşu (2.8 – 25 μm) este extrem de specific, fiind amprenta compusului dat. De asemenea, există o relație directă între intensitatea absorbției energiei radiante şi cantitatea de material absorbant prezent. Acest lucru se aplică la absorbția oricărei forme de energie radiantă, de la raze X la undele radio. Prin alegerea experimental lungimea de undă a absorbției maxime, poate fi determinată concentrația unui compus dintr-un eşantion.



Diverse tipuri de spectrofotometre utilizate în laboratoarele de toxicologie medico-legală

Spectrofotometrul este folosit pentru a măsura absorbția de energie radiantă şi constă dintr-o sursă de radiație, o celulă pentru probă prin care trece radiația şi un detector pentru măsurarea absorbției radiației. lungimi de undă mai aplică la analiza toxicologice sunt ultraviolete, vizibile, şi infra-roşu. instrumentele comerciale utilizate pentru măsurarea absorbției de aceste forme de lumina poate varia de la simple colorimetre, utilizat pentru a măsura de absorbție în spectrul vizibil, pentru a spectrofotometre extrem de sofisticat care utilizează lumina monocromatica si electronice sensibile pentru a detecta, amplifica, şi niveluri scăzute record de radiatii. În timp ce diverse forme de analiză spectroscopice pot fi

aplicate pentru a analiza toxicologie medico-legale, numai spectrofotometria în ultraviolet va fi discutată aici.

Absorbția radiației ultraviolete (UV) poate duce la tranzițiile electronice în moleculele organice, provocând promovarea electronilor de pe orbitalele cu energie minimă (starea fundamentală) pe orbite de mare energie. Lungimea de undă a maximului de absorbție va depinde de grupările chimice prezente în moleculă, de natura solventului în care compusul este dizolvat, de pH-ul şi temperatura soluției. Soluțiile apoase şi alcoolice sunt cele mai utilizate de toxicologi.

Trasarea grafică a absorbanței unui compus în raport cu lungimea de undă (210-350 nm) reprezintă spectrul de absorbție în ultraviolet. Majoritatea medicamentelor de interes toxicologice absorb lumina din regiunea ultraviolet. Spectrul UV este caracteristic unui compus, în condiții experimentale şi poate fi utilizat pentru identificarea prezenței unui anumit medicament. Cu toate acestea, identificarea nu este univocă deoarece numeroşi compusi pot prezenta acelaşi spectrul UV. De exemplu, amfetamina, efedrina, metamfetamina, feniletilamina, propoxifenul şi multe alte medicamente posedă maxime de absorbție în UV, în soluție acidă la 263, 257 şi 252 nm. Se preferă acum separarea compuşilor prin HPLC şi apoi înregistrarea spectrului UV pe măsură ce drogurile izolate eluează de pe coloană. Concentrația medicamentului poate fi determinată prin compararea intensității absorbției la lungimea de undă unde absorbția este maximă cu concentrații de standarde de droguri pure analizate în aceleaşi condiții experimentale.

Spectrometria de masă

În spectrometria de masă, un compus este bombardat cu un fascicul de electroni care produce fragmentarea moleculei cu formare de fragmente ionizate pozitiv şi cu mase moleculare diferite. Dintr-o moleculă dată se obțin numai anumite fragmente şi masele acestora formează un spectru caracteristic acelei substanțe. Acest lucru este posibil deoarece molecula încărcată electric nu are toate legăturile identice şi cele mai slabe se vor rupe mai uşor. Fragmentele încarcate electric sunt separate şi detectate în funcție de masele lor atomice. Spectrul de masă indică proporția fiecărui fragment (abundența relativă) la un raport masă-supra-sarcină specific. În condiții experimentale, fragmentarea moleculelor complexe conduce la un spectru caracteristic datorită faptului că fragmentarea este extrem de specifică şi permite adesea o identificare fără echivoc.

Izolarea opiaceelor din probele biologice

Extracția cu solvent. Extracția cu solvent a fost utilizată de decenii pe scară largă pentru izolarea de opioide din probele nebiologice, plante şi umane. Recent, a fost descrisă microextracția în fază lichidă (LPME) de Rasmussen şi colaboratorii [23], precum şi de grupul Ugland [24].

Exemple de determinări toxicologice

DETERMINAREA TOXICILOR MINERALI

METODE GENERALE DE IZOLARE (MINERALIZAREA)

Toxicitatea moleculară şi toxicitatea atomică

Aşa cum s-a arătat la capitolele despre toxici gzoşi şi volatili, dinte care o mare parte sunt compuşi organici – efectul lor toxic se datoreşte moleculei întregi sau unor funcții prezente în moleculă şi nu elementelor componente. Toxicitatea benzenului este determinată de molecula întreagă C_6H_6 şi nu de atomul de C şi H; toxicitatea nitroderivaților se datoreşte funcției NO_2, respectivCN etc. Acest gen de toxicitate este denumită toxicitate moleculară.

Dinpotrivă, în cazul toxicilor minerali, toxicitatea este conferită de elementul mineral di diferişi compuşi:

- cation : As^{3+}; As^{5+}; Hg^{2+}; Mn^{2+}; Ba^{2+}; Tl^{+}, etc.;
- anion : Fe
- sare : $Hg(CN)_2$. $Pb_3(AsO_5)_2$ etc.;
- acizi şi baze tari: H_2SO_4; NaOH etc.

La cele ma multe cazuri, toxicitatea se datoreşte deci, nu moleculei întregi, ci elementuliu mineral. De exemplu, în compuşii de arsen, unde acesta se află, fie sub formă de cationi (As^{3+} sau As^{5+}), fie sub formă de anioni As---- toxicitatea, de diferite intensități, este conferită de elementul arsen. Este aşa numita toxicitate atomică (Fabre). Ea se manifestă numai în cazul substsnțelor solubile şi ionizabile ($BaCl_2$) sun toxici puternici, iar sărurile insolubile ($BaSO_4$, $BaCO_3$) sunt netoxice.Totuşi $BaCO_3$ poate fi solubilizat în organism de către HCl din sucul gastric, trecând în $BaCl_2$, ionizabil şi deci toxic.

Prin urmare, în cazul intoxicației cu compuți ai metalelor toxice, trebuie să se cerceteze în primul rând cationul (As, Hg, Pb; etc.).

Este însă necesar uneori să se precizeze şi natura anionului, care poate avea o toxicitate proprie : de exemplu $Hg(CN)_2$ este toxică atât datorită Hg^{2+} cât şi CN^-. În intoxicațiile cu acizi şi baze, se cercetează direct prezența acestora.

În practică, toxicologul este solicitat să separe, să indentifice şi să dozeze toxicii minerali din diverse produse.

Izolarea toxicilor minerali (săruri metalice, acizi, baze).

În organism toxicii minerali pot exista sub formă ionică dau de combinații complexe (ptoteinați ai metalelor grele) puțin sau de loc ionizabile.

Compuții ionizabili pot fi uşor ouşi în evidență în maceratul apos al produsului de analizat(organe,etc), pe când combinațiile proteice alemetalelor grele neionizabile nu pot fi depistate direct. În acest cazse impunerea distrugerea materiei organice pentru a "demasca" toxicul,eliminând acțiuneaeliminând acțiuneaturbatoare a substanțelor proteice şi ionizându-l din nou.

Rezultă deci că toxicii minerali pot fi separați din produsele organice pe două căi.

- compuşii ionizabili (acizi, baze, săruri) nu necesită distrugerea materiei organice şi sunt separați prin: antrenare cu vapori, dializă, electrodializă, ultrafiltrare prin membrană poroasă:,

- compuşii nionizabili (compuşi ai metalelor grele) reclamă distrugerea materiei organice, pe cale uscată sau umedă.

Teste preliminare

În toate cazurile se recomandă folosirea inițial, a unor teste preliminare de orientare.

Testul celmai folosit este testul Reinsch : podusul de analizat se tratează cu HCl 10% pentru descompunerea proteinaților metalelor grele şi obținerea clorurilor ionizabile. Se menține se menține produsul timp de 1 ½ oră pe B.M., apoi se filtrează prin tifon. Se introduce în lichid o sârmă de cupru decapată)degresată în alcool, eterți apoi tratată cu HCl sau HNO_3 şi în final spălată cu apă distilată. ionii metalelor mai slab electropozitive (As, Hg, Sb) se vot depune pe sîrmă sub forma unor pete. O tehnică îmbunătățită este folosirea mai multor lame din diferite metale (zinc, fier, cupru şi platină); după culoarea petei depuse pe una din lame, se deduce, cu oarecare siguranță , metalulcare se află în produsul de analizat.

Dstrugerea materiei organice şi izolarea toxicilor minerali

Operația de distrugere a materiei organice se realizează pe cale uscată sau umedă.

În raport cucondițiile de lucru, didtrugerea poate fi completă sau parțială, pentru a permite desfacerarea ionică a toxicului din complexul organomineral inițial.

La alegerea modului de distrugere trebuie să se țină sema de:

- obțonerea unei mineralitîți sastifăcătoare;
- evitarea pierdereii de toxic prin volatilizare (Hg, F), deflagrare, absorbție, etc.
- evitarea unei tehnici laborioase sau costisitoare;
- evitarea folosirii reactivilor în cantități mari (pentru a nu dilua produsul de analizat, în care deja toxicul se află în cantități mai mici, dispersat într-o mai mare de produs);
- în cazul distrugerii cu clor, este obligatorie îndepărtarea alcoolului, pentru a nu se produce explozie; în acest scop, produsul se alcalinizează uşor cu Na_2CO_2 şi se încălzeşte pe B.M. la 40-50°;
- evitarea transformării toxicului în produşi nedecelabili (de exemplu trecerea fosfatului şi hipofosfitului în acid fosforic);
- Folosirea reactivilor puri şi a sticlăriei neutre, pentru a nu introduce în analiză, pe această cale, elemente cercetate (AS, Pb, etc.)

Pentru distrugere, metalele se pregătesc în modul următor:

- produsele solide (alimente plante) se mărunțesc şi se omoginizează;
- produsele lichide (urină, etc.) în volume mari, se alcalinizează şi se concentrează pe B.M. (în cazul distrugerii sulfonitrice);
- materialul în cantitate mare(viscose 300-500 g; făină 100 g) se poate distruge în porțiuni mici, ce se reunesc apoi pentru analiza finală.

Principalele metode de distrugere a materiei organice în analiză toxicologică se poate reprezenta schematic astfel:

1. calcinare directă (simplă)
2. calcinare cu adaos de oxidant şi substanțe poroase

a) azotat de potasiu (Orfila)

I. Calcinare (incinerare)

b) oxid de magneziu (Geneuil)
c) oxi şi azot de magneziu
3. calcinarea cu carbonat şi azotat de sodiu
4. calcinarea în curent de oxigen
(cu recuperarea metalelor volatile)

II. Oxidare umedă

1. distrugerea cu clor nativ(acțiunea litică a Clorului) $HClO_3 + Cl$
2. distrugerea în mediu H_2SO_4, singur cu adausuri (carbonizare sulfurică)
a) H_2SO_4 (Flandin-Danger)
b) $H_2SO_4 + HNO_3$
c) $H_2SO_4 + HNO_3 + H_2O_2$ (Truffert)
d) $H_2SO_4 + HNO_3 + HClO_4$ (Kahane)
e) $H_2SO_4 + NH_4NO_3$ (Stepanov)

I. Distrugerea prin calcinare

Fiecare din metodele de distrugere uscată are avantajele şi dezavantajele ei.

1. Calcinarea directă permite:

- obținerea unei cenuşi fără materie reziduu organic, în care metalul se găseşte în cea mai mare parte sub formă de carbonat;
- Concentrația maximă a toxicului; în schimb: în schimb operația este laborioasă şi de lungă durată, necesitând uscarea prealabilă;
- are loc pierdere de toxic, atât prin umflare şi debordare, cât şi mai ales prin volatilizarea metalelor (Hg, Zn, Cd), a oxizilor metalici (As) sau a sărurilor, în special cloruri (Sb,As);
- distrugerea este incompletă atunci când cărbunele este inclus în topirea carbonaților alcalini.

Pentru minimalizarea acestor inconveniente, calcinarea se face în prezență de oxidant şi alcalinizant.

2. Calcinarea cu adaus de oxidanți (ŞI SUBSTANȚE POROASE):

Încă Orfila a folosit ca oxidant azotatul de potasiu. Prin acest mod, faza reducătoare, în care compuşii sunt reduşi la metal (uneori volatili) este micşorată la maximum. Totuşi rămâne pericolul pierderii de toxic prin deflagare (cărbunele împreună cu azotatul de potasiu formează un amestec exploziv).

Mai târziu Géneuil a adăugat ca oxidant şi în acelaşi timp alcalinizant, oxidul de magneziu; aceştia deşi este oxidant alb, conferă porozitate mase de calcinat, uşurând oxidarea cu oxigen atmosferic. în plus, scade temperatura de combustie, minimalizând pierderile, mai ales că metalele oxiacide (As) trec sub formă de săruri nevolatile.

Metoda a fost îmbunătățită ulterior de Marthulé şi Kohn-Abrest, care au adăugat o sursă de oxigen: azotatul de potasiu.

3. Calcinarea cu carbon şi azotat de sodiu constituie o altă variantă a calcinării.

4. Calcinarea în curent de oxigen: deşi asigură o distrugere mai rapidă, poate produce pierderi de toxic, de aceea trebuie utilizată o aparatură specială pentru recuperarea minerali volatilizați.

Indiferent de variantă, calcinarea este exclusă pentru cercetarea mercurului.

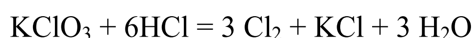
II. Distrugere pe cal umedă

Se realizează, fie cu clor născând, fie cu acizi oxigenați (H_2SO4 , HNO_3), cu sau fără adaus de alți oxidanți (H_2O_2, $HClO_4$, etc.).

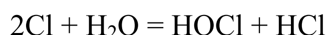
1. Distrugere cu clor născând

Metoda propusă de Dufles şi Millon (1838), Abreu (1844), a fost perfecționată de Jaquelin (1845). Frésenius şi Bobo (1844), Abreu (1849), Ogier (1891) şi mai târziu Stepanov.

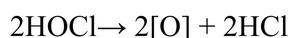
Principiul metodei Distrugerea materiei organice se realizează prin acțiunea clorului liber (în stare născândă), care rezultă prin descompunerea cloratului de potasiu în reacția cu acidul clorhidric concentrat. Corul reacționează cu apa formând acid hipocloros, care dă naştere la oxigen printr-o reacție al cărei echilibru este deplasat spre dreapta (în sensul formării oxigenului) în prezența substanței organice, acceptor de oxigen. Au loc reacțiile:



$KClO_3 + 6HCl = 3\ Cl_2 + KCl + 3\ H_2O$



$2Cl + H_2O = HOCl + HCl$



$2HOCl \rightarrow 2[O] + 2HCl$

HCl nu trebuie să fie mai concentrat de 12%, pentru că în cazul As s-ar forma $AsCl_3$, uşor volatillă.

Agentul oxidant al materiei organice este oxigenul care la naştere prin descompunerea acidului hipocloros.

1.a. Varianta Feresenius – Bobo. Tehnica de lucru

Materialul de analizat (100 – 500 g) cântăriți şi măsurați fin se introduce într-un balon Wurtz.

Dacă proba biologică este lichidă se concentrează pe B.M. Dacă proba conține alcool etilic, se supune evaporării pentru îndepărtarea acestuia, deoarece clorul în prezență de alcool etilic produce explozie.

În balonul Wurtz se adaugă peste produsul de analizat 10 – 15 ml apă distilată şi $KClO_3$ cristale în cantitate de 1/10 față de greutatea probei supuse analzei.

Se montează balonul pe o baie de apă cu temperatura de 50 - 70°C. Balonului se adaptează o pâlnie de separație prin care se introduce acid clorhidric conc., în porțiuni mici la intervale de 15 minute (50 – 100 ml acid clorhidric conc.).

Tubul lateral al balonului este introdus într-un vas spălător conținând 20 – 30 ml soluție NaOH 10% sau apă distilată pentru captarea excesului de clor şi a compuşilor volatili care ar lua naştere din acțiunea clorului asupra arsenilui ($AsCl_3$) (fig. 19).

Fig. 19.

Operațiunea de distrugere a materiei organice se consideră terminată când tot materialul a fost digerat şi lichidul are o culoare verde – gălbuie datorită clorului în exces, în general pe suprafața lichidului pluteşte un strat gălbui de grăsime.

1. b. Varianta Ogier

Toxicologul francez Ogier aduce îmbunătățiri metodei Feresenius – Bobo. Modificarea adusă de Ogier constă în trecerea unui curent de HCl gazos peste materialul de analizat amestecat cu $KClO_3$. Metoda are avantajul că timpul de distrugere este redus la maximum 1 oră pentru o cantitate de 1000 – 1500 g organe, însă pretinde prezența cercetătorului care conduce operațiunea.

Tehnica de lucru

Materialul biologic cântărit şi mărunțit se aduce în balonul de distrugere A (fig. 20), se adaugă apă până la volumul final de 1000 – 1500 ml, apoi clorat de potasiu în porțiunea de 1 : 10 față de greutatea materialului biologic.

Fig. 20

În balon se adapează un dop rodat cu două tuburi: pentru unul din tuburi, care ajung până la fundul balonului A; se introduc HCl gazos, prin celălalt, introdus într-un cilindru cu apă (B), se culeg porțiunele volatile şi excesul de clor. În balonul B se află HCl concentrat peste care se lasă să picure H_2SO_4 concentrat, prin pâlnia C. Balonul se încălzeşte şi HCl gazos trece în vasul spălător C, ce conține HCl, apoi ajunge la robinetul cu trei căi K, prin care este dirijat, fie în balonul de distrugere A, Fie în vasul spălător F (atunci când reacția din balonul A este prea intensă).

Distrugerea materiei organice (cu excepția grăsimilor şi glucidelor) este terminată în cca. 30 minute.

1.c. Varianta Stepanov. Organele sunt introduse într-un balon Pirex, închis cu un dop prin care trece un tub în spirală, cu rol de refrigerent (fig.21). Peste organe se adaugă HCl, atât cât este necesar pentru ca în final concentrația să nu depăşească 12%, apoi se adaugă mici cantități de $KClO_3$ (procedeu inițiat (Feresenius – Bobo).

Fig. 21.

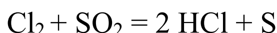
Instalația se montează pe baia de apă. Se continuă introducerea de clorat de potasiu, până ce culoarea lichidului rămâne galben deschis – verzui, când distrugerea se consideră terminată.

În toate cele trei variante, mineralizarea se consideră terminată când masa din balon devine un lichid floconos, galben – verzui.

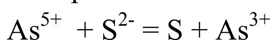
Se filtrează, se diluează cu apă 1 : 1 şi se concentrează pe baia de apă. Se tratează mineralizantul cu $NaHSO_3$ cristale sau se barbotează SO_2 pentru eliminarea excesului de clor.


$NaHSO_3 + Cl_2 + H_2SO_4 = 2 NaCl + H_2SO_4$

Excesul de clor împedică precipitarea sulfurilor H_2S (acesta ar fi oxidat la sulf).


$Cl_2 + SO_2 = 2 HCl + S$

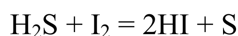
Bioxidul de sulf (sau $NaHSO_3$) în plus reduce şi compuşii de As^{5+} la compuşii As^{3+}, mai uşor de depistat.


$As^{5+} + S^{2-} = S + As^{3+}$

Lichidul se răceşte, când apare la suprafață apare un strat de grăsime, ia la fund se depune un sediment verzui, format de țesut conjunctiv nesolubilizat, o parte di grăsimi şi bariul sub

formă de $BaSO_4$, nu însă şi clorurile insolubile de Pb şi Ag şi nici sulfaţii de Pb şi Sr, căci mediul puternic acid asigură solubilitatea cantităţilor mici ale acestor săruri.
Se filtrează pe hârtie de filtru. Toxicii – în raport cu natura lor – se afă fie dizolvaţi în lichidul de mineralizare, fie depuşi în sediment sau incluşi în stadiu de grăsime de unde trebuie extraşi.
Avantajele metodei de distrugere cu clor născând:
- distrugerea se realizează rapid şi destul de economic.
Dezavantajele:
- nu se distruge totalitatea materiei organice; totuşi se obţine ionizarea tuturor materialelor, inclusiv a celor legate iniţial în compuşi organici;
- o parte metale rămân insolubilizate pe filtru ($BaSO_4$ şi urme de $PbSO_4$ şi AgCl)

Determinarea hidrogenului sulfurat
A. Izolare
Hidrogenul sulfurat se izolează din aerul zonelor de muncă şi din aerul comunal prin barbotare în soluţii absorbante.
B. Identificare
1. Hârtia de filtru îmbibată cu acetat de plumb se î**nnegreşte** în prezenţa H_2S deoarece se formează sulfura de plumb.
2. Hârtia de filtru se îmbibă în acetat de cadmiu se îngălbeneşte în prezenţa H_2S deoarece se formează sulfura de cadmiu.
3. Hârtia de filtru iod amidonată (albastră) este decolorată de H_2S în urma reducerei ionului la I^-.

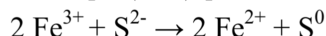


$H_2S + I_2 = 2HI + S$

C. Dosare – Metoda Stan şi colaboratorii.
Principiul metodei : Hidrogenul sulfurat reduce ionul fier (III)la fier (II), iar acesta reacţionează cu α, α’ - dipiridil formând un complex roşu care se detrmină specrofotometric la 520 nm.



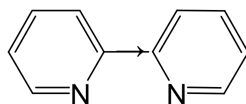
$2\ NH_4[Fe(SO_4)_2] + H_2S \rightarrow 2\ FeSO_4 + (NH_4)_2SO_4 + H_2SO_4 + S$

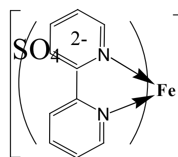


$2\ Fe^{3+} + S^{2-} \rightarrow 2\ Fe^{2+} + S^0$

2+

$FeSo_4$ + 3





3.Reactivi
R_1. Soluţie apoasă 0,30% de sulfat dublu de fier (III) şi amoniu.
R_2. Soluţiile α, α’ - dipiridil 0,020 g α, α’ - dipiridil se introduc într-un balon cotat 100 ml, se adaugă 5ml alcool metilic şi se completează cu apă distilată la semn.
R_3. Soluţia absorbantă: 1 ml R_1 se amestecă cu 2 ml R_2 şi se adugă 2 ml apă distilată.
R_4. Soluţia etalon : 0,2305 g sulfat dublu de fier (II) şi amoniu sare (Mohr) se adaugă în balon cotat de 100 ml, se adaugă 3 picături de acid sulfuric conc. Şi se completează la semn

cu apă distilată. Din această soluție se iau 2 ml şi se completează cu apă distilată la 100 ml. 1ml = 1o µg H_2S.

<u>Modul de lucru</u> într-un microabsorbitor se aduc 5 ml soluție absorbantă (R_3) şi se aspiră aerul de cercetat cu debit de 0,5 litri /min, notându-se volumul de aer recoltat.

Recoltarea se face până la o colorație roşie vizibilă, este bine să se facă față de un etalon care conține 20-25 µg H_2S până când colorația probei este aproximativ comparabilă cu cea a etalonului.

Conținutul vasului de absorbție se aduce cantitativ într-o eprubetă gradată de 10 ml (prin spălături repetate cu cantități mici de apă) şi apoi se completează cu apă distilată la 10 ml. Aceasta constituie proba de analizat.

Paralel cu pregătirea probei de analizat se prepară o scară etalon. În eprubete gradate de 20ml se aduc: 0,5; 1,0; 2,0; 2,5 ml soluție etalon, corespunzător concentrațiilor de 5, 10, 15, 20, 25 µg H_2S şi apoi se completează cu apă distilată la 8,0 ml după care se adaugăîn fiecare eprubetă câte 2,0 ml α, α' - dipiridil 0,2%.

În acelaşi timp se prepară şi un martor al reactivilor.

Reactivi(ml)	Eprubeta					
	1	2	3	4	5	6
Sol. Etalon(10 µg H_2S/ ml)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	-
Conc. µg.	5	10	15	20	25	-
Apă distilată	7.5	7.0	6.5	6.0	5.5	8.0
α,α'- dipiridil	-	-	2.0	-	-	2.0
0,2 %	Agitare 15' repaus					

După un repaus de 15 minute se determină densitatea optică a probi de analizat şi a scării etalon la 520 nm, în cuva de 1 cm, față de un martop, cu extincțiile scării etalon se tasează curba de etalonare.

Valoarea densității optice a probei de analizat se raportează la curbade etalonare şi deaflă cantitatea de H_2S.

<u>Calculul</u>

mg H_2S/ mc aer = C/V în care:

C = µg H_2S din proba de analizat

V= volumul de aer recoltat, exprimat în litri

DETERMINAREA OXIDULUI DE CARBON

Oxidul de carbon din aer

Indentificare

Hârtia îmbibată cu clorură paladoasă este înnegrită de CO. Pentru mărirea sensibilității reacției, aerul se aspiră cu ajutorul pâniei Palmer (sau a dispozitivului similar) în care se găseşte fixată în hârtie îmbibată cu Pd Cl_2. Reacția este inerferată de H_2S.

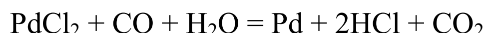
Formarea carboxihemoglobinei aerul este barbotat prin sânge diluat 1/100 şi se cercetează apariția benzlor caracteristice CoHb (vezi metoda spectroscopică în sânge).

Dozare

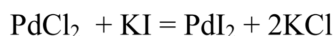
Metodele se referă la determinarea oxidului de carbon (CO), gazos din aerul zonelor de muncăsau aerul communal.

Metoda spectrofotometrică (cu clorură paladoasă).

Principiu: Oxidul de carbon reduce clorura paladoasă la paladiu metallic. Deoarece în metodă se foloseşte un exces de clorură paladoasă, acasta dă cu iodura de potasiu, iodură paladoasă, roşie colorimetrabilă. Cantitatea de CO intrat în reacţie se obţine prin diferenţă:



$PdCl_2 + CO + H_2O = Pd + 2HCl + CO_2$



$PdCl_2 + KI = PdI_2 + 2KCl$

Sensibilitatea metodei este de 1 mg/ml. Metoda nu este specifică, fiind inerferată de toţi reducătorii din aer (H_2S, SO_2, aldehide, pulbere diverse).

Reactivi

Corura paladoasă, p.a. soluţie 0,1% : se usucă clorura paladoasă într-o etuvă la 105˚C, timp de o oră şi se lasă înexicator la întuneric până a doua zi. Se cântăresc o,5 g $PdCl_2$ şi se introduce într-un Erlenmeyer, peste care se adaugă 150ml apă distilată şi 2,5 ml HCl concentrate. Soluţia se încălzeşte pe baie de apă până la dizolvarea completă a $PdCl_2$. După răcire soluţia se tranzvazează într-un balon cotat de 500 ml şi se completează la semn cu apă distilată. Se păstrează în flacoane brune la rece. 1ml = 1 mg $PdCl_2$.

Iodură de potasiu, soluţia 20%, preparată extemporaneu.

Recoltarea probelor.

Dacă în aerul de analize nu se găsesc şi alte gaze reducătoare care să interfereze reacţia dintre CO şi $PdCl_2$, ca H_2S, SO_2, aldehide etc., recoltarea aerului se face prin dislocuire de apă sau cu vas vidat.

În cazul prezenţei acestor gaze, pentru eliminarea lor, se spală în prealabil, trecându-l prin două absorbitoare montate la tubul de intrare a aerului în vasul de recoltare cu dubla tubulatură conţinând primul 20 ml NaOH 10% şi al doilea 20 ml acetat de plumb (Fig.13.)

Volumul minim de aer pentru o probă este de 1 litru.

Modul de lucru

Vasele cu aerul recoltat se răcesc, fie la gheaţă, pentru a secontracta aerul din interior. Se introduce apoi prin pâlnioară 2 ml soluţie de clorură paladoasă exact măsuraţi. Se separă pâlnioara de 3 ori cu câte 1-2 ml apă care se introduc tot în vas. Este de menţionat că introducerea soluţiei de $PdCl_2$ şi a apei trebuie făcută cu atenţie pentru a nu introduce aer din exterior de aceea, se lasă totdeauna în pânioară puţină soluţie sau apă ca supapă de siguranţă.

Vasul de recoltat se lasă să stea la întuneric până a doua zi (sau minimum 4 ore) agitându-se din când în când.

Dacă în vas s-a format o oglindă de paladiu metallic şi soluția este complet decolorate – ceea ce denotă reducerea completă a $PdCl_2$ se mai adaugă 1 ml soluție $PdCl_2$ şi se lasă din nou în repaus 4 ore.

După acest timp se scoate dopul vasului şi se filtrează conținutul într-un balon cotat de 100ml. Vasul şi pâlnioara se spală cu 50 ml apă care se trece cantitativ tot în balonulcotat. Se adaugă apoi 15 ml soluție KI 20% tot prin filtru şi se completează balonul cotat, splându-se filtrul cu apă, la semn.

Se măsoară extincția la un spectrofotometru de tip Sprkol, la λ = 500 nm, în cuva de 1 cm, față de o probă martor.

Curba de standerdizare se face între 1 şi 2 mg $PdCl_2$, prin puncte din 0,5 în 0,5 mg, în condițiile descries mai sus. Cu extincțiile obținute se construeşte curba standar sau se calculează factorul de pantă.

Reactivi(ml)	Balon cotat (100 ml)				
	1	2	3	4	5 (M)
Sol. $PdCl_2$(1 mg / ml)	0.5	1.0	1.5	2.0	-
Conc. mg.	0.5	1.0	1.5	2.0	
KI 20%	15				
Apă distilată	la 100 agitare				

Λ= 500 nm

Calculul

Rezultatele se exprimă în mg Co/m^3 aer.

Se calculează excesul de clorură paldoasă, valoarea „a”

În care:

a = mg $PdCl_2$ ne reacționată (excesul);

E = extracția citită

Λ = factorul de pantă.

Se calculează apoi cantitatea de Co care a redus clorura paladoasă:

În care:

n = cantitatea de $PdCl_2$ folosită inițial;

V = volumul de aer recoltat în litri;

1 mg $PdCl_2$ este redus de 0,1261 ml CO (la 0˚ şi 760 mm presiune);

0,1261 ml CO= 0,1 mg CO.

Observații:

Recoltarea probelor de aer se poate efectua şi prin aspirarea aerului într-un balon vidat care conține o fiolă de 2 ml $PdCl_2$ şi care după recoltate se sparge prin agitarea flaconului, punându-se astfel reactivul în contact cu aerului recoltat, apoi se continuă analiza ca mai sus.

Normele republican în vigoare fiind pentru oxidul de carbon CMA = 30 mg/mc aer.

Oxidul de carbon din sânge

Metoda spectroscopică

Principiu: Oxihemoglobina şi carboxihemoglobina dau spectre de absorbţie, constituite fiecare din câte două benzi asemănătoare, însă uşor deplasate una faţă de alta. Prin tratarea cu un reducător - -hidrosulfit, polisulfură, clorură stanoasă, etc.-numai HbO_2 este redusă la Hb, fapt constatat prin dispariţia celor două benzi caracteristice ale HbO_2 şi apariţia benzii de absorbţie a Hb. În aceleaşi condiţii, HbCO îşi păstrează cele două benzi.

Modul de lucru

Se face diluţie 1% din sânge, cu apă distilată şi se divide în două porţiuni, care se examinează la spectroscop.

Prima porţiune, examinată ca atare la spectroscop, prezintă un spectru caracteristic pentru oxihemoglobină şi anume, două benzi întunecate: prima bandă, mai îngustă, în zona galbenă, la 750μm la dreapta liniei D a lui Frauenhofer (85-90 gradaţii micrometrice): a doua bandă, mai lungă, în zona verde, la 538 μm, la stânga liniei E a lui Frauenhofer (95-105 gradaţii micrometrice).

A doua porţiune de lichid este tratată cu câteva picturi de polisulfură de amoniu 10% sau câteva cristale de hidrosulfit şi după câteva minute este examinată spectroscopic: apare spectrul caracteristic hemoglobinei reduse, deoarece HbO_2 a cedat oxigenul reducătorului. Spectrul este format dintr-o singură bandă întunecată (banda Stokes) ale cărei margini nu sunt perfect delimitate, amplasată între liniile D şi E al lui Frauenhofer.

Dacă sângele conţine oxid de carbon se observă la spectroscop două benzi asemănătoare celor ale HbO_2, însă uşor deplasate în domeniul verde. La tratarea cu un reducător, aceste două benzi nu dispar spre a se forma banda Stokes şi această comportare este caracteristică carboxihemoglobinei (Fig.14.)

Fig.14. – Spectre de absorbţie ale HbO_2 Hb, CoHb, MetHb, şi a derivaţilor lor.

Oxihemoblina, hemoglobina şi carboxihemoglobina pot fi decelate numai în sângele proaspăt.

Metoda spectroscopică prezintă o mare sensibilitate şi este indicată pentru identificarea sigură a oxidului de carbon, cu condiţia ca sângele să nu fie putrefiat şi să conţină minimum 3 val.???? ml sânge.

2. Metoda Wolf

Metoda se bazează pe proprietatea $HbCO_2$ dea coagula complet la pH = 5,0 – 5,1 şi t = 55˚C, lichidul rămânând incolor. În aceste condiţii, COHb nu coagulează şi lichidul rămâne colorat.

Soluţia tampon pH = 5,0 – 5,1 : se ia un volum soluţie acid acetic 5N (300 g %) şi 3 volume de soluţie de $CH_3COONa.3H_2O$ 3N (408 g ‰).

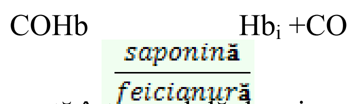
Se diluează 1 ml sânge cu 4 ml apă distilată şi se filtrează. La 1 ml filtrat se adaugă 4 ml soluţie tampon, se omogenizează, se închide eprubeta şi de menţine 5 minute pe baie de apă la 55˚C.

În aceste condiții HbO_2 coagulează complet, iar lichidul rămâne incolor dacă nu conține COHb; în caz contrar, lichidul este roz. Se verifică spectroscopic natura culorii roşii, prin poziția benzilor, înainte şi după reducere hidrosulfit.
Metoda pateu fi utilizată şi pentru dozare.

<u>Determinarea carboxihemoglobinei</u>

<u>Principiu</u>: CO legat de Hb în complexul COHb este eliberat din complex la tratarea sângelui cu un hemolizant (saponină, digitoxină) şi un oxidant (fericianură de potasiu):

COHb Hb$_i$ +CO



Operația se execută într-o celulă de microdifuzare în care se găseşte o cantitate cunoscută de clorură paladoasă, redusă stochiometric de CO eliberat din sânge, ceea ce permite calcularea CO prin dozarea excesului de clorură paladoasă şi indirect carboxihemoglobina corespunzătoare.
Metoda se pretează numai pentru sângele proaspăt.
În condițiile normale (în atmosfera obişnuită a oraşelor) se găsesc în sânge până la 1,5% COHb lanefumători şi până la 8 – 10% COHb la fumători. Simptome clinice de intoxicație apar în general când proporția de COHb din sânge depăşesc 15%.

<u>Reactivi şi aparatură</u>

1. Clorura paladoasă ($PdCl_2$) soluție standard 1 ml = 1,0 mh $PdCl_2$. Se dizolvă 0,1000g clorură paladoasă în 0,5 ml HCl d = 1,19 şi 5ml apă, încălzind în baia la fierbere până la dizolvare completă. Se trece cantitativ soluția într-un balon cotat de 100ml şi se adduce la semn cu apă distilată. Soluția se conservă la întuneric şi la rece.
2. Hemolizant – fericianură: se dizolvă 1 g fericianură de potasiu 1 g saponină în 100 ml apă. Se prepară extemporeneu.
3. . Iodură de potasiu, soluție 20%. Se prepară extempreneau.
4. 4.Celula microdifuzie. Este un recipient de sticlă cu două compartimente: unul central, cilindric (C) şi altul periferic, inelar (B). Celula se închide ermetic cu o placă de sticlă şlefuită (celula Conway) sau cu un dop şlefuit (celula Menziceanu) (Fig.15.).

Fig.15. Celula Menzicescu

<u>Recoltarea probelor</u>

Se recoltează 2-5 ml sânge venes într-un tub mic (care să se umple complet cu sânge) conținând 10 mg oxalat de potasiu pulbere şi o bilă de sticlă.
Se astupă tubul cu un dop de cauciuc sau plastic, fără a include aer şi se omogenizează răsturnând tubul de 10-15 ori, fără a scurta. Probele asfel pregătite pot fi păstrate la rece până la 24 ore fără pierdere de COhb.

<u>Difuzia</u>

Se pipetează exact 1,0 ml clorură paladoasă standard în compartimentul central al celulei şi 5 ml hemolizat-fericianură în compartimentul periferic. Se pipetează în compartimentul

periferic exact 1,0 ml sânge bine omogenizat şi se închide imediat celula. Capsula sau dopul se ung cu vaselină sau, preferabil cu pastă de silicon.
Se amestecă lichidul din compartimentul periferic, rotind cu precauție celula ținută orizontal (să nu teacă lichid dintr-un compartiment într-altul). Se lasă celula la întuneric până a doua zi sau minimum 6 ore.

Dozarea spectrofotometrică
Se deschide celula şi se pipetează cu grijă lichidul din compartimentul central, trecându-l într-un balon cotat de 50 ml, printr-un filtru mic. Se spală compartimentul central de 5-6 ori cu câte 1 ml apă (luat cu aceiaşi pipetă) care se trece tot în balon, prin acelaşi filtru. Se adaugă în balon 10 ml iodură de potasiu şi de aduce la semn cu apă.
Se execută aceleaşi operații pentru celula - standard.
Se măsoară extincția probelor (E_p) şi a standardului (E_s) la $\lambda = 500$ nm în cuva 1 cm, în compensație cu o probă conținând 10 ml KI 20% la 50 ml apă.
Cacul
1 mg $PdCl_2$ este redus de 0,1261 ml CO, degajat din =,=941 g COHb. Notând cu E_p extincția probei şi cu E_s extincția standardului, clorură paladoasă redusă este:
„n” mg $PdCl_2$ redus = $E_a – E_b / E_a$

Proba fiind de 1 ml sânge, coținutul de CO în ml/100 ml sânge este:
ml CO/100 ml sânge = n . 0,1261 . 100
E COHb/100 ml sânge = n . 0,0941 . 100
Pentru exprimarea rezultatelor în COHb din hemoglobina totală, se determină, din aceiaşi recoltare de sânge, hemoglobina totală şi de face raportul:
COHb din Hb totală =(gCOHb/100ml sânge/ g din Hb totală /100 ml sânge)x100
Determinarea spectrofotometrică a hemoglobinei totale
Metoda se referă la determinarea hemoglobinei totale din probe de sânge.
Principiu: hemoglobina se transformă în cianohemoglobină stabilă şi cu coeficient molar de extincție specific. Concentrația hemoglobinei se obține prin măsurarea extincției la $\lambda = 540$ nm a unei soluții de hemoglobină transformată în cianohemoglobină.
Valorile totale sunt:
- Pentru bărbați : 14 - 16,5 g hemoglobină/100 ml sânge.
- Pentru femei : 13 – 16 g hemoglobină/100 ml sânge.

Reactivi:
1. Soluția Drabkin. Se dizolvă succesiv: 0,05 g cianură de potasiu, 0,2 g fericianură de potasiu şi
0,14 g fosfat monosodic (Kh_2PO_4) în 100 ml apă. Se adaugă 0,5 g saponină ți se amestecă. Soluția se conservă indefinit, în sticle brune şi la rece.
Modul de lucru

Se măsoară într-o eprubetă exact 5,0 ml soluție Drabkin. Se introduce 0,02 ml sânge congelat, cu ajutorul pipetei de hemoglobină, spălând pipeta de 3 ori cu soluția din eprubetă. Se amestecă fără a scutura. Se poate lucra şi măsurând 0,2 ml sânge în balon cotat de 50 ml, aducând la semn cu soluție Drabkin.
Se măsoară după 10 minute, în cuva de 1 cm, în compensație cu soluția Drabkin.

Calculul

Greutatea moleculară a hemoglobinei fiind de 16114, iar coeficientul de extincție molar la 540 nm, $K^{540} = 11 . 10^{-3}$, se deduce:

g Hb totală/100 ml sânge = E^{540} x 16114/11000 x 10^{-1} x 5.02/ 0.02

Efectuând calculul numeric, rezultă că:

g Hb totală/100 ml sânge = E^{540} . 36,8

Dacă de lucrează cu 0,2 ml sânge, diluat la50 ml cu soluție Dranbkin, formula devine:

g Hb totală/100 ml sânge = E^{540} . 36,8

Observații:

1. Determinarea COHb şi Hb toate se efectuează din aceeaşi probă de sânge.
2. Determinarea nu se poate după proba de sânge dacă este coagulată.

Interpretarea rezultatelor

Se consideră intoxicație cronică oxicarbonemie peste 1 ml/ 100 ml sânge (la analize repetate) şi intoxicație acută, la valori peste 3 ml/100 ml sânge; în comele oxicarbonice se regăsesc 6 – ml CO /100 m l sânge (rezultatele sunt valabile numai dacă s-a făcut dozarea în primele 3 ore de la intoxicare).

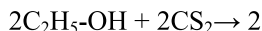
DETERMINAREA SULFURII DE CARBON

A. Izolare

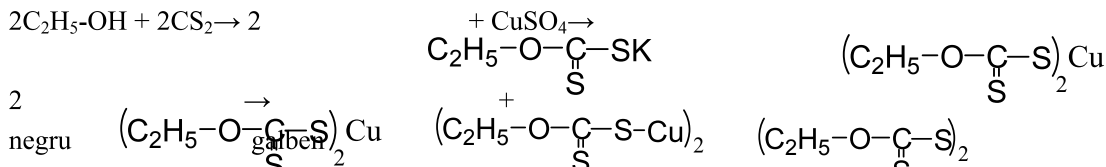
- din aer: se barbotează aerul în soluții alcolice de amine secundare
(dietilamina sau piperidina):
- din alimente: organe, etc. prin antrenare de vapori de apă, sau preferabil, cu un curent de aer şi fixare în soluție alcoolică de amine secundare, sau alcool răcit ci gheață.

B. Identificare

1. Reacția xantogenaților: la 2 ml distilat se adaugă 2-5 picături soluție alcoolică de KOH 15% şi se încălzeşte uşor; se acidulează slab cu acid acetic 1% şi se tratează cu 2-3 picături sulfat de cupru 5%. Se formează inițial un precipitat negru de xantogenat cupric, care trece prin dismutație în xantogenat cupros, galben:



$2C_2H_5\text{-}OH + 2CS_2 \rightarrow 2$ $C_2H_5-O-C(=S)-SK$ $+ CuSO_4 \rightarrow$ $(C_2H_5-O-C(=S)-S)_2Cu$

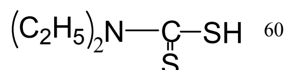


2 $(C_2H_5-O-C(=S)-S)_2Cu$ $\rightarrow$ $(C_2H_5-O-C(=S)-S-Cu)_2$ $+$ $(C_2H_5-O-C(=S)-S)_2$

negru galben

2. Reacția cu amine secundare (alifatice sau piperidină): la 2 ml distilat se adaugă 2-5 picături de soluție alcoolică de amină secundară 2% şi 2-5 picături acetat de cupru 0,05%, când apare un precipitat galben de ditiocarbonat de cupru:

a) dietilamina



$(C_2H_5)_2N-C(=S)-SH$

$(C_2H_5)_2NH + CS_2 \rightarrow$ + $(C_2H_5)_2NH \rightarrow$ $(C_2H_5)_2N-C(=S)-S-N(C_2H_5)_2$

$+ Cu(CH_3COOH)_2 \rightarrow$ $(C_2H_5)_2N-C(=S)-S)_2Cu$ $+ 2CH_3COOH + 2NH(C_2H_5)_2$

b) cu piperidina

$C_5H_{11}N + CS_2 \rightarrow$ $C_5H_{10}N-C(=S)-SH$ $+ Cu(CH_3COO)_2 \rightarrow$ $(C_5H_{10}N-C(=S)-S)_2Cu$ + $2CH_3COOH$

3. <u>Reacția de formare a sulfocianurii ferice</u>: 3-4 ml distilat se încălzeşte pe baia de apă cu un exces de soluție alcoolică de amoniac, apoi se evaporă la sicitate. Se reia reziduul cu puțină apă distilată, se acidulează cu HCl şi se filtrează pentru a îndepărta sulful depus din descompunerea H_2S. Filtratul se tratează cu $FeCl_3$ 2%, când apare colorația roşie – sânge de $Fe(SCN)_3$:

$S{=}C{=}S + HNH_2 \rightarrow S{=}C(NH_2){-}SH \rightarrow HS{-}C({=}NH){-}SH \rightarrow N{\equiv}C{-}SH + H_2S$

$3\ N{\equiv}C{-}SH + 3NH_3 \rightarrow 3\ N{\equiv}C{-}SNH_4 + FeCl_3 \rightarrow Fe(SCN)_3 + 3\ NH_4Cl$

8. <u>DETERMINAREA AMINELOR</u>

8.1. <u>AMINA</u>

A. <u>Izolare</u>:

- din aer: se barbotează aerul prin acid sulfuric 0,01 N sau apă bidistilată;
- din produse biologice: antrenare cu vapori de apă, urmată sau nu de extragere cu solvent organic.

B. <u>Identificare</u>

a. <u>Reacția izonitrilului (reacția Hoffman):</u> la 1 ml lichid se adaugă 0,1 ml soluție alcoolică de KOH 10% şi 2 picături de $CHCl_3$; la fierbere se dezvoltă miros neplăcut de izonitril (fenilcarbilamină):

$C_6H_5NH_2 + 3\ KOH + CHCl_3$

b. <u>Reacția noveinei</u>: 1 ml lichid este tratat cu 1 ml hipoclorit de sodiu 10%; apare o colorație albastră, ce virează încet la roşu – murdar:

4 $C_6H_5NH_2$ + HOCl → [fenazină: HN–, $\overset{+}{N}$, N, NH_2] Cl^-

c. <u>Reacția Jacquemin</u>: la 1 ml lichid se adaugă 1 ml fenol 1% şi 0,5 ml hipoclorit de sodiu 10%, când apare o colorație albastră, datorită formării fenilchinoniminei (v. "fenolul").

C. <u>Dozare</u>

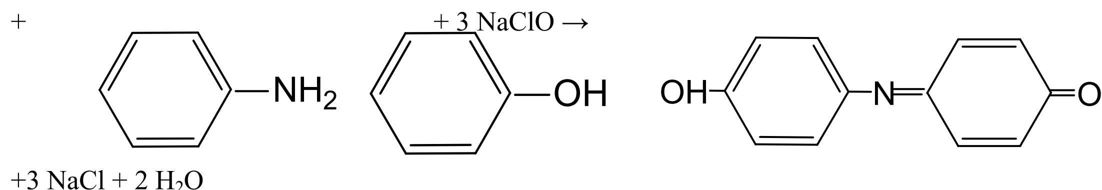
<u>Metoda spectrofotometrică pentru anilină (Metoda Alexeeva)</u>

Metoda se referă la determinarea anilinei : C_6H_5-NH_2: vapori din aerul zonelor de muncă.

<u>Principiu</u>. Anilina în prezența fenolului şi a cloraminei sau hipocloritului de sodiu ca oxidant, dă o colorație albastră, prin formare de idofenoli, colorimetrabilă reacția Jacquemin).

Sensibilitatea metodei este de 0,5µg.ml. Metoda nu este specifică, deoarece interferă şi alte amine aromatice (toluidină, paraamisidină, parafenilendiamină) ca şi amoniacul.

+ + 3 NaClO →



+3 NaCl + 2 H_2O

Reactivi

1. soluție absorbantă: apă bidistilată
2. Cloramina T: CH_3-C_6H_4 - $SO_2N(Na)Cl$. $3H_2O$, soluție 4% (proaspăt preparată).
3. Fenol, soluție 3%.
4. Hidroxid de sodiu, soluție 2%.
5. Standard stoc: se cântăresc într-un balon cotat de 25 ml, în H_2SO_4 0,01 N: o cantitate de anilină pură (1 -2 picături), astfel ca să se obțină o soluție de ordinul a 0,1mg/ml.
6. Standard de lucru: o parte alcoolică din standardul stoc se diluează H_2SO_4 0,01 N pentru a obține o soluție în care 1 ml -10 µg anilină.

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 2 litri aer, cu un debit de 0,2 litri/minut, prin două microabsorbitoare montate în serie, conținând câte 2 ml soluție absorbantă.

În afară de microabsorbitoare destinate recoltării de probe, se prevăd încă două microabsorbitoare cu câte 2 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Conținutul fiecărui microabsorbitor se transvazează separat în câte o eprubetă gradată, completându-se la 5 ml cu soluție absorbantă. Se adaugă 1 ml cloramina T 4% se agită, se lasă în repaus 2 minute, apoi se adaugă 1 ml soluție fenol şi 0,5 ml soluție NaOH 2%.

În mod similar se prelucrează şi probele martor.

Se măsoară extincția, după 15 – 20 minute, la spectrofotometrul Spekol, la λ = 615 nm în cuva de 1 cm, în compensație cu proba martor.

Curba de standardizare se face între 5 şi 25µg anilină, prin puncte din5 în 5, în condițiile descrise mai sus. Cu extincțiile obținute se construieşte curba standard sau se calculează factorul de pantă.

Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba standard, obținându-se concentrațiile C_1 şi C_2 a anilinei, în µg din cele două microsorbitoare.

Reactivi(ml)	Eprubeta					
	1	2	3	4	5	6
Standard de lucru(10 µg / ml)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	-
Conc.µg	5	10	15	20	25	-
Apă bidistilată	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	5.0
Cloramină T 4%	0.5 agitare					
Fenol 3 %	1.0 agitare					
NaOH 2 %	0.5 agitare Repaus 10-15 minute					

Cap. III Analiza firului de păr

1. Introducere

Urina a devenit proba cea mai acceptată pentru detectarea consumului de droguri. Popularitatea utilizării acestui material pentru depistarea drogurilor se leagă de faptul că, spre deosebire de sânge, prelevarea probei de urină nu are nevoie de supraveghere medicală. Cu toate acestea, pentru a se asigura că proba de urină este autentică, ea este adesea necesar să se respecte subiectul producătoare de specimen. Această încălcare a vieții private poate cauza jena la unii indivizi şi ca rezultat rezistenta la participarea la un program de testare de droguri.

Deoarece majoritatea consumului de droguri sunt eliminate din organism în termen de două la trei zile după utilizare, urină. Analiza este, de asemenea, limitat în capacitatea sa de a detecta expunerea la medicament. În cazul în care se ştie că un ecran de droguri va fi necesare pe o anumită zi, ca o condiție de angajare, de exemplu, abstinenta câteva zile "înainte de urina fiind colectate vor duce la utilizatorul de droguri merge nedetectate. Este din cauza acestor probleme asociate cu analiza urinei ca exemplarele alternative au fost investigate pentru potențialul lor de indicatori fiabili ai expunerii la medicament. Până în prezent, matricea cele mai promițătoare pentru detectarea consumului de droguri pare a fi de păr.

2. Considerații generale despre păr

Acesta a fost cunoscut de zeci de ani, care urma a metalelor în organism se acumulează în păr şi pot fi detectate săptămâni sau chiar luni după expunerea inițială. Numeroase articole au fost publicate descriu detectare de metale grele în păr, şi o parte din această activitate vor fi discutate mai târziu de la un istoric perspectivă. Investigațiile mai recente s-au concentrat pe utilizarea de păr ca un eşantion de detectare a farmaceutice şi consumului de droguri. pregătirea probei şi tehnici analitice au fost dezvoltate şi rafinate pentru a permite o analiză pentru o serie de medicamente în cât mai puțin câteva miligrame de păr. În teorie, analiza de păr consumului de droguri, ofera mai multe avantaje față de utilizarea a corpului fluide.
Un eşantion de par pot fi colectate fără a fi nevoie de facilități speciale sau echipamente, sau medical personal instruit.

Colectarea unei probe mici de păr este relativ non-invazivă şi, spre deosebire de urină, acest eşantion nu poate fi uşor modificat prin diluare sau utilizarea altor medicamente înainte de test.

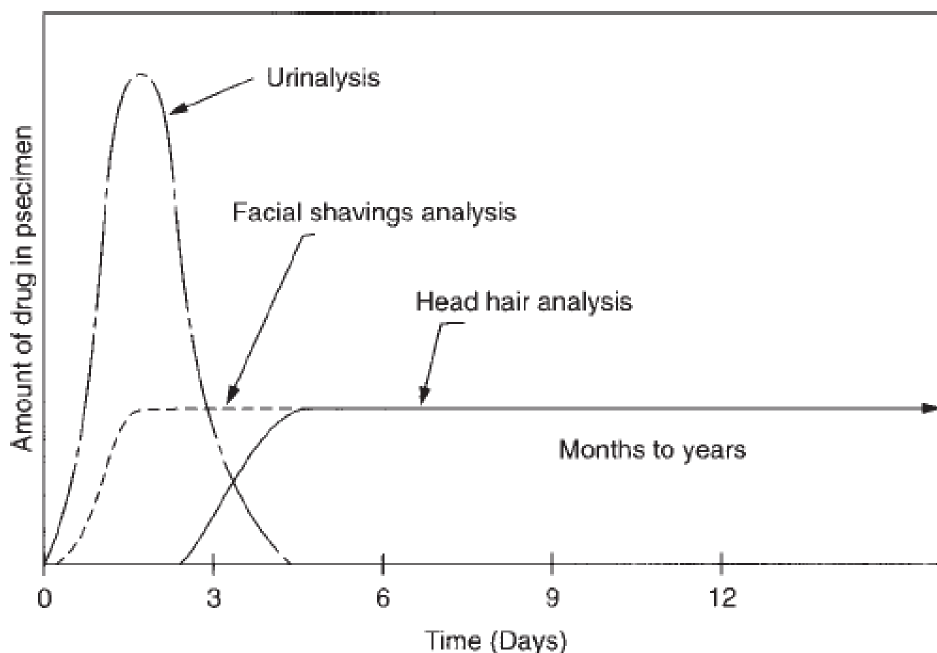


Figure 5.1 Accumulation of drugs in urine and in hair as a function of time (Baumgartner *et al.,*1989)

Acumularea de droguri în urină şi în păr ca o funcție de timp (Baumgartner et al., 1989)

Stabilitatea de droguri în păr matrice a fost ilustrată într-un caz, sărbătorită în care cocaină şi metaboliții săi, benzoylecgonine şi ester metilic ecgonine, au fost găsite în probe de păr de la vechi rozatoare peruvian frunze de coca datând de la AD 100 (Springfield et al, 1993). Odată colectate, proba de păr nu are nevoie de cerințe speciale de păstrare şi ocupă mult mai puțin spațiu de stocare de probe de urina. • Deoarece parul creste la aproximativ 1 cm / lună, proba oferă o înregistrare pe termen lung de droguri utilizare, chiar si cu parul relativ scurt, care deține mai multe săptămâni sau chiar luni de informații (Figura 5.1). Abstinenta de la utilizarea de droguri pentru câteva zile, nu se va evita, prin urmare, de detectare. În general, este recomandat ca firele de păr 5-10 fi folosite pentru analiză, deşi publicații recente descrie utilizarea de cât de puțin 5-10 mg de păr şi barbă, chiar aşchii au fost folosite cu succes. Majoritatea lucrătorilor au descris vârful, sau coroana, a capului ca fiind proba cea mai uniformă a păr pentru analiză, deşi par din alte zone ale corpului a fost folosit. În timp ce trage de par va avea ca rezultat în eşantion mai reprezentativ, acest lucru este evident, dureros pentru subiect şi majoritatea mostrelor sunt colectate de tăiere. Ar trebui subliniat faptul că părul trebuie să fie tăiat cât mai aproape de scalp este posibil, în scopul de a a obține creşterea economică cea mai recentă.

Modelul, în general, propuse pentru a explica încorporarea de medicamente în păr este una în care medicamentele intra parul prin difuziune pasivă din sange in celule în creştere de la baza foliculului pilos (Figura 5.2). Păr uman creste in cicluri, cunoscut sub numele de anagen, catagen si telogen faze (BOST, 1993). Anagen este faza de crestere, o durată de doi la

trei ani, iar rata de creştere este în general, 0.3-0.4 mm / zi sau 0.9 - 1.2 cm / luna. În timpul acestei faze, alimentarea cu sânge capilar în jurul folicul furnizează nutrienți şi oferă, de asemenea, orice materiale străine care ar putea fi în sânge, cum ar fi droguri sau metale. Aceste urme compuşi deveni încorporat în firul de par şi sunt transportate pe toata lungimea ei ca parul creste. faza catagen este o tranziție între activ creşterii economice şi o fază de odihnă. rădăcina firului de păr devine keratinizate, formând un capăt club, şi începe să se despartă de bec sau papila foliculului de par. parul apoi se duce într-o fază de creştere nu-cunoscut sub numele de telogen. Acest lucru durează două-trei luni înainte de creştere a firului de par un nou începe să apară în papilei dermice. Aşa cum se creste, parul vechi vor fi forțat să iasă. ai multe descoperiri recente, totuşi, sugerează că drogurile pot intra de păr de la multe site-uri prin diferite mecanisme şi momente diferite ale cresterii firului de par. Henderson (1993) propune un model mai complex de încorporare de droguri în păr:

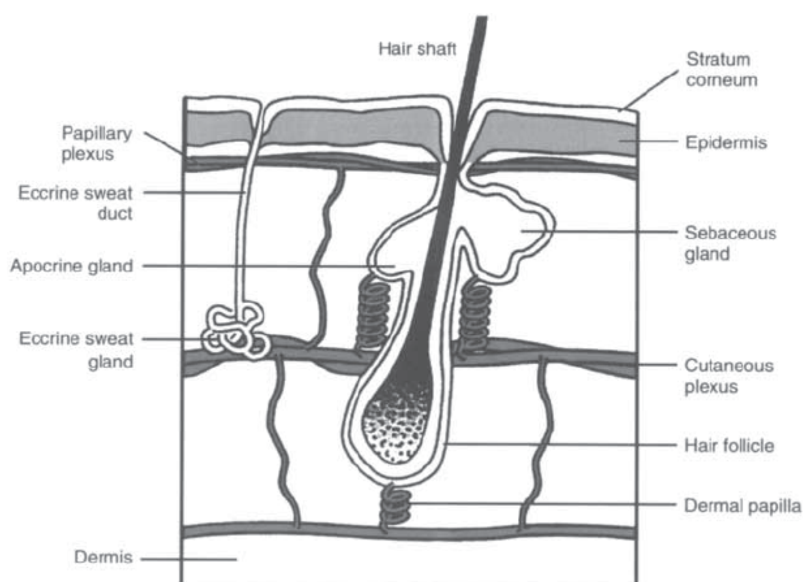


Figure 5.2 Diagram of a hair follicle (Harkey, 1993)

• timpul de formare a arborelui
• în timpul difuzie din sânge la folicul activ în creştere
• după formarea prin secretii ale glandelor sebacee şi apocrine
• după ce părul a reieşit din piele, din mediul extern.

Pötsch et al. (1997) au propus un concept biochimice pentru încorporarea endogenă de droguri
molecule care ajută să explice unele dintre contradicțiile aparente şi inconsecvențe în păr de droguri
de cercetare. Acest model se bazează pe principiile biologice de transport prin membranele celulare şi biotransformare, şi consideră că efectul de afinitate melanina de droguri.

Pötsch şi Moeller (1996), în studierea adoptarea de Rodamină B în păr, au arătat penetrare să fie mult mai mare de soluție apoasă decât din metanol / etanol solvent. Ei au propus că Rodamină B este un model potrivit pentru studierea adoptarea de droguri de bază din mediul extern. Efectul tratamentului cosmetic cu privire la interpretarea de droguri endogene a fost studiat de către Skopp et Al. (1997). Ei au ajuns la concluzia că istoria cosmetice a unui eşantion de păr ar trebui să fie luate în considerare, dar că efectul de tratamente cosmetice, cum ar fi albit sau perming pe şuntul endogen-exogene a fost mic. Drogurile pot fi transferate la parul de la mai multe compartimente de corp situat în țesuturile înconjurătoare foliculului pilos (Figura 5.3). Aceste mecanisme ar putea fi, de asemenea, de consumul de droguri specifice, crescând probabilitatea de detectare a anumitor medicamente în timp ce alții mai greu de detectat. O mai precisă înțelegere de încorporare de droguri în părul este critic pentru interpretare.

Criticii de analiză de păr pentru medicamente susțin că există prea multe întrebări fără răspuns în ceea ce priveşte fiabilitatea tehnicii pentru a fi acceptat ca o metodă de rutină pentru testarea de droguri. Deşi această tehnică este în fază incipientă şi sub rezerva o anumită sumă de critici, utilizarea de păr ca un eşantion de examinare toxicologică medico-legală nu este deloc nou. detectare de metale grele otrăvuri şi contaminanți din mediul înconjurător în păr uman a fost bine documentate de mai mulți ani.

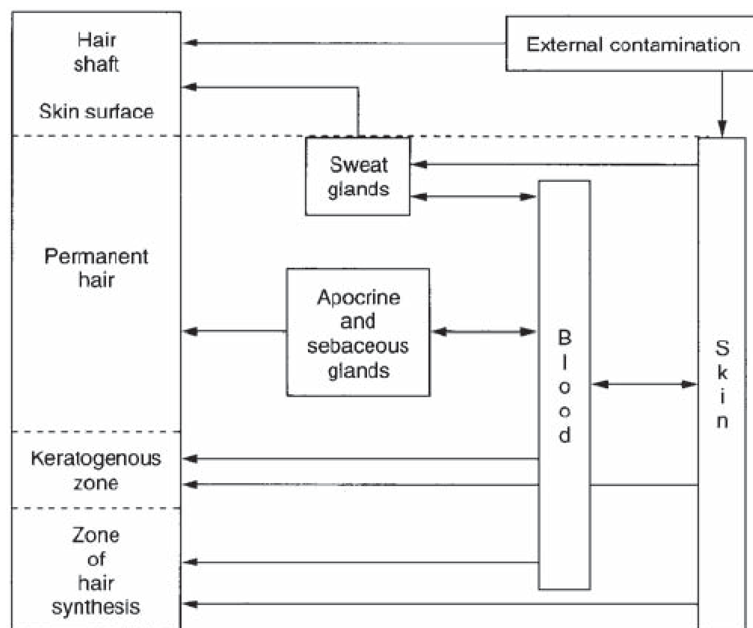


Figure 5.3 Proposed multi-compartment model for drug incorporation into hair (Henderson, 1993)

A propus modelul multi-compartiment pentru încorporarea de droguri în păr (Henderson, 1993)

Înainte de a discuta meritele relative ale analizei păr de droguri, poate ar trebui să ne examineze ceea ce a fost deja stabilite cu privire la depunerea de metale grele în această probă. Multe dintre aspecte, cum ar fi vârsta, sexul, starea boală şi contaminare, care pot avea o influență asupra încorporarea de medicamente în păr, au fost deja considerate ca fiind influențează încorporarea metale grele în acest specimen.

3. Studii supra metalelor grele

Utilizarea probelor de păr matern ca mijloc de estimare a expunerii fătului la metalele toxice a fost descrisă de către Marsh et al. (1981) într-un studiu pe 84 mame irakiene şi pe copiii lor, care au fost expuşi la metilmercur în timpul sarcinii. Metilmercurul a fost ingerat ca fungicid, iar concentrațiile maxime ale mercurului în părul matern par a fi legate de frecvența simptomelor de toxicitate la mame în timpul sarcinii şi la efectele neurologice la sugari. O relația doză-răspuns între sânge şi țesuturi acumularea de păr de cobalt a fost demonstrat, de asemenea la şobolani (Nation et al, 1983.).

Adult şobolani hrăniți rațiile zilnice ale Chow laborator dantelat cu clorură de cobalt au fost testate pentru comportamentale efectele şi aceste efecte au fost corelate cu nivelurile de cobalt determinată prin absorbție atomică. Analize relevat un efect doză-răspuns în ceea ce priveşte acumularea de țesut cobalt în sânge, țesuturi diferite şi păr. Un studiu ulterior comparat concentrațiile de păr şi efectele comportamentale de nichel la şobolani (Nation et al, 1985).. Şobolanii masculi adulți au fost hrănite 0, 10, sau 20 mg Ni / kg greutate corp prin intermediul unui rația alimentară zilnică de 10 g.

Următoarele 14 zile de expunere, animalele au fost instruiți într-o perioadă de 61 de zile pentru a-pârghie de presă pentru alimente în timp ce continuă să experiență doze zilnice de nichel. Cei şobolanii tratați cu 20 mg / kg Ni leverpressed la o rată semnificativ mai mică decât controalele. Absorbție atomică analiza spectrofotometrică scos la iveală o acumulare doză-răspuns de nichel în rinichi, dar analizele de alte probe, inclusiv parul nu a prezentat acumulări diferențial agent. O lipsă similară de corespondență între sânge şi nivelurile de păr de plumb a fost raportat de Grandjean (1984). O femeie care a fost otrăvit cu rea intenție de către doze frecvent pe cale orală de nitrat de plumb pe parcursul unei perioade lungi de timp nu a fost diagnosticat ca atare până la aproximativ cinci luni de la primele simptome au apărut. Analiza de par luate la două niveluri diferite ori a fost folosit ca probă în instanță. Concentrațiile de păr duce expuse schimbări rapide şi normalizat la scurt timp după tratament chelator a fost instituit. Această constatare sugerează că nivelul de plumb părul poate reflectă un nivel de absorbție curent, mai degrabă decât de conținut de plumb din sânge integral, care, în acest caz, schimbat mult mai lent. Alte dovezi de lipsa de corelare între concentrațiilor de plumb în sânge şi părul a fost găsit într-un studiu de păr lucrătorilor expuşi la un nivel ridicat de plumb din aer. În ciuda niveluri extrem de ridicate plumb din sânge şi intoxicație severă plumb clinice, concentrațiile de plumb în păr au fost relativ scăzut.

Părul s-a dovedit a fi nepotrivit pentru determinarea aluminiului cu scopul de a estimarea funcției renale (de-Wolff, 1985). Mai multe boli legate de dializă pot fi atribuite la o ar creşte povara corp din aluminiu. Determinarea acestui metal în eşantioanele clinice este, prin urmare, de

mare ajutor în diagnosticul, tratamentul şi prevenirea intoxicație aluminiu. de-Wolff, cu toate acestea, arătat că există multe capcane în estimarea de aluminiu în fluide biologice, şi recomandă ca aceste teste de performanță ar trebui să fie limitată la laboratoare specializate participă la un program de evaluare externă a calității. Lipsa de corelație între expunerea şi concentrațiile de aluminiu par a determinat de-Wolff să se constate că parului pare a fi de nici un folos pentru evaluarea poverii corp de aluminiu în fiecare pacient în parte.

Deşi părul şi ale căilor urinare concentrații de zinc s-au dovedit a fi scăzut la copii de statură, sau prelungită după infecție respiratorie superioară, analiza de par pentru zinc asemenea, sa constatat nu fi de încredere pentru diagnosticarea unor astfel de condiții, din cauza variabilității excesiv în indivizi (van Wouwe et al., 1986). Singura observatie care ar putea fi făcut a fost că, în comparație cu controale, zinc păr a fost scăzut în mod semnificativ după infecție respiratorie şi de înaltă în statura mica.

Posibilitatea ca interacțiunea dintre diferiți compuşi în corpul subiectului poate influența încorporarea unui medicament în părul a fost ridicat. Preocupări similare pe interacțiunea dintre metalele toxice dietetice şi urme au fost investigate la şobolani (Elsenhans et al, 1987.). Expunerea la metalele toxice şi esențială este considerat a fi reflectate de metal concentrațiile corespunzătoare în țesuturi. Cu toate acestea, acesti compusi pot influența reciproc în ceea ce priveşte păstrarea lor în organism. În scopul pentru a testa această ipoteză, un regim alimentar de bază, care conține 20 ppm fiecare din cele patru metale toxice (arsenic, cadmiu, nichel şi plumb) şi cantități adecvate de metale esențiale a fost alimentat la şobolani timp de două săptămâni. Test grupuri a primit dieta de bază, cu concentrații crescânde, unul din metale toxice (până la 90 ppm arsenic, 180 ppm cadmiu, nichel 365 ppm, plumb şi 394 ppm). Arsenic, cadmiu, nichel, plumb, cupru, fier, mangan şi zinc au fost determinate prin spectroscopie de emisie atomică în ficat, rinichi, intestin, creier, muşchi, oase, piele, sânge şi păr.

O relație liniară între alimentație şi de concentrare țesuturi a fost observată pentru arsenic şi nichel în rinichi, de cadmiu în ficat, şi pentru plumb în oase. În alte țesuturi saturație a fost observată. În timp ce interacțiunile cadmiu-fier au fost cele mai multe comune din țesuturi, alte interacțiuni au fost detectate doar în țesuturile specifice, de exemplu: arsenic-cupru în rinichi, cadmiu-zinc în ficat, şi-mangan arsenic, cadmiu, mangan sau cupru-nichel în intestinului. Creşteri de plumb şi cadmiu renale intestinal de nichel dietetice, şi o scădere în os arsenic de plumb dietetice, au fost mai pronunțate interacțiunile dintre metalele toxice. Rezultatele a demonstrat că organe-țintă potențiale pentru evaluarea expunerii metal trebuie să fie atent analizate pentru a interveni interacțiunile metal-metal. Este posibil ca interacțiuni similare dintre dietetice elemente şi / sau a produselor farmaceutice cu medicamente de abuzuri pot influența absorbția şi acumularea acesteia din urmă în părul unui individ. O asemenea interacțiune ar fi un factor suplimentar de fi luate în considerare în interpretarea de concentrații de droguri în păr.

Un obiectiv principal al acestei societăți este de a asigura calitatea în testarea de păr, şi, în acest scop de membrii societate au fost activ în dezvoltarea interlaboratoare testele de control al calității (Kintz şi Cirimele, 1997; Sachs, 1997). Rezultatele acestor teste indică faptul că locul de muncă mult încă trebuie să fie făcut pentru a îmbunătăți fiabilitatea şi

coerența metodelor de încercare şi protocoale. Nu este mult să fie pozitiv despre în măsurile luate de societate. Poate că în anii care vin este posibil să se adopte un mod mai puțin abordare prudentă şi mai pozitivă la utilizarea de păr ca un mijloc de analiză a drogurilor.

References

ANON., 1990, Drug free workplace conference: speaker rebuts common drug testing myths and severely criticizes hair testing. *Forensic Drug Abuse Advisor,* **2,** 81–84.
ANON., 1997, Society of Hair Testing. *Forens. Sci. Int.,* **84,** 3–6.
BALABANOVA, S., ARNOLD, P.J., LUCKOW, V., BRUNNER, H. and WOLF, H.U., 1989, Tetrahydrocannabinols in hair of hashish smokers. *Z.Rechtsmed.,* **102,** 503–508.
BALABANOVA, S. and HOMOKI, J.Z., 1987, Determination of cocaine in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Z.Rechtsmed.,* **98,** 235–240.
BAUMGARTNER, A.M., JONES, P.F., BAUMGARTNER, W.A. and BLACK, C.T., 1979, Radioimmunoassay of hair for determining opiate abuse histories. *J.Nucl. Med.,* **20,** 748–752.
BAUMGARTNER, A.M., JONES, P.F. and BLACK, C.T., 1981, Detection of phencyclidine in hair. *J.Forens. Sci.,* **26,** 576–581.
BAUMGARTNER, W.A. and HILL, V.A., 1993, Sample preparation techniques. *Forens. Sci. Int.,* **63,** 121–135.
BAUMGARTNER, W.A., HILL, V.A. and BLAHD, W.H., 1989, Hair analysis for drugs of abuse. *J.Forens. Sci.,* **34,** 1433–1453.
BLANK, D.L. and KIDWELL, D.A., 1993, External contamination of hair by cocaine; an issue in forensic interpretation. *Forens. Sci. Int.,* **63,** 145–156.
BOST, R.O., 1993, Hair analysis—perspectives and limits of a proposed forensic method of proof: a review. *Forens. Sci. Int.,* **63,** 31–42.
CHEN, G.J., PILLAI, R., ERICKSON, J.R., MARTINEZ, F., ESTRADA, A.L. and WATSON, R.R., 1991, Cocaine immunotoxicity: abnormal cytokine production in Hispanic drug users. *Toxicol. Lett.,* **59,** 81–8.
CIRIMELE, V., SACHS, H., KINTY, P. and MANGIN, P., 1996, Testing human hair for cannabis. III. Rapid screening for the simultaneous identification of ?9-tetrahydrocannabinol, cannabinol and cannabidiol. *J.Anal. Toxicol.,* **20,** 13–16.
CLARK, D.R., OGASAWARA, P.A., SMITH, G.J. and OHLENDORF, H.M., 1989, Selenium accumulation in racoons exposed to irrigation drainwater at Keterson National Wildlife Refuge, California 1986. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.,* **18,** 787–794.
CONE, E., 1990, Testing human hair for drugs of abuse. I. Individual dose and time profiles of morphine and codeine in plasma, saliva, urine, and beard compared to drug induced effects on pupils and behavior. *J. Anal Toxicol.,* **14,** 1–7.
CONE, E.J., YOUSEFNEJAD, D., DARWIN, W.D. and MAGUIRE, T., 1991, Testing human hair for drugs of abuse. II. Identification of unique cocaine metabolites in hair of drug abusers and evaluation of decontamination procedures. *J. Anal. Toxicol.,* **15,** 250–255.

CURCURUTO, O., GUIDUGLI, F., TRALDI, P., STURARO, A., TAGLIARO, F. and MARIGO, M, 1992, Ion trap mass spectrometry applications in forensic sciences. I.

Identification of morphine and cocaine in hair extracts of drug addicts. *Rapid Commun. Mass Spectrom.,* **6,** 434–437.
DE-WOLFF, F.A., 1985, Toxicological aspects of aluminum poisoning in clinical nephrology. *Clin.Nephrol.,* **24,** S9-S14.
DOREA, J.G., MERCHAN-HAMMAN, E., RYAN, D.E. and HOLZBECHER, J.G., 1989, Retention of antimony in hair during leishmaniasis treatment. *Clin. Chim. Acta,* **179,** 341–345.
ELSENHANS, B., SCHMOLKE, G., KOLB, K., STOKES, J. and FORTH, W., 1987, Metal-metal interactions among dietary toxic and essential trace metals in the rat. *Ecotoxicol. Environ. Safety,***14,** 275–287.
FAERGEMANN, J., ZEHENDER, H., JONES, T. and MAIBACH, I., 1991, Terbinafine levels in serum, striatum corneum, dermis-epidermis (without stratum corneum), hair, sebum and eccrine sweat. *Acta Derm. Venereol. Stockh.,* **71,** 322–326.
FORMAN, R., SCHNEIDERMAN, J., KLEIN, J., GRAHAM, K., GREENWALD, M. and KOREN, G., 1992, Accumulation of cocaine in maternal and fetal hair; the dose response curve. *Life Sci.,* **50,** 1333–1341.
FRANCESCHIN, A., MOROSINI, L. and DELL'ANNA, L., 1987, Detection of morphine in hair with the Abbott TDx. *Clin. Chem.,* **33,** 2125.
GRAHAM, K., KOREN, G., KLEIN, J., SCHNEIDERMAN, J. and GREENWALD, M., 1989, Determination of gestation cocaine exposure by hair analysis. *J. Am. Med. Assoc.,* **262,** 3328–3330.
GRANDJEAN, P., 1984, Lead poisoning: hair analysis shows the calendar of events. *Human Toxicol.,* **3,** 223–228.
GOLDBERGER, B.A., CAPLAN, Y.H., MAGUIRE, T. and CONE, E.J., 1991, Testing human hair for drugs of abuse. III. Identification of heroin and 6-acetylmorphine as indicators of heroin use. *J.Anal. Toxicol.,* **15,** 226–231.
HARKEY, M.R., 1993, Anatomy, and physiology of hair. *Forens. Sci. Int.,* **63,** 18.
HARKEY, M.R., HENDERSON, G.L. and ZHOU, C., 1991, Simultaneous quantitation of cocaine and its major metabolites in human hair by gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.,* **15,** 260–265.
HENDERSON, G.L., 1993, Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forens. Sci. Int.,* **63,** 19–29.
HENDERSON, G.L., HARKEY, M.R., ZHOU, C. and JONES, R.T., 1992, Cocaine and metabolites in the hair of South American coca chewers. *J. Anal. Toxicol.,* **16,** 199–201.
KALASINSKY, K.S., MAGLUILO, J. and SCHAEFER, T., 1993, Hair analysis by infrared microscopy for drugs of abuse. *Forens. Sci. Int.,* **63,** 253–260.
KAUERT, G. and RÖHRICH, J., 1996, Concentrations of ?9-tetrahydrocannabinol, cocaine and 6-monoacytlmorphine in hair of drug abusers. *Int. J. Legal Med.,* **108,** 294–299.
KELLER, T., MIKI, A., REGENSCHEIT, P., DIRNHOFER, R., SCHNEIDER, A. and TSUCHIHASHI, H., 1998, Detection of designer drugs in human hair by ion mobility spectrometry (IMS), *Forens. Sci. Int.,* **94,** 55–63.

KIDWELL, D.A., 1993, Analysis of phencyclidine and cocaine in human hair by tandem mass spectrometry. *J. Forens. Sci.,* **38,** 272–284.
KINTZ, P. and CIRIMELE, V., 1997, Interlaboratory comparison of quantitative determination of amphetamine and related compounds in hair samples. *Forens. Sci. Int.,* **84,** 151–156.
KINTZ, P., CIRIMELE, A., TRACQUI, A. and MANGIN, P., 1995, Simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylendioxyamphetamine and 3,4,-methylendioxymethamphetamine in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Chromat. B.,*670, 162–166.
KINTZ, P., LUDES, B. and MANGIN, P., 1992a, Detection of drugs in human hair using Abbott Adx with confirmation by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Forens. Sci.,* **37,** 328–331.
KINTZ, P. and MANGIN, P., 1993, Opiate concentrations in human head, axillary and pubic hair. *J. Forens. Sci.,* **38,** 657–662.
KINTZ, P., TRACQUI, A. and MANGIN, P., 1992b, Tobacco, drug and narcotic abuse during pregnancy. Evaluation of *in utero* exposure by analysis of hair of the neonate. *Presse Med.,* **21,** 2139–2141.
KINTZ, P., TRACQUI, A. and MANGIN, P., 1992c, Detection of drugs in human hair for clinical and forensic applications. *Int. J. Legal Med.,* **105,** 1–4.
KLEIN, J., GREENWALD, M., BECKER, L. and KOREN, G., 1992, Fetal distribution of cocaine: case analysis. *Pediatr. Pathol.,* **12,** 463–468.
LANDRY, M.J., 1992, An overview of cocaethylene, an alcohol derived psychoactive cocaine metabolite. *J. Psychoactive Drugs,* **24,** 273–276.
MARIGO, M., TAGLIARO, F., POIESI, C., LAFISCA, S. and NERI, C., 1986, Determination of morphine in the hair of heroin addicts by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Anal. Toxicol.,* **10,** 158–161.
MARQUES, P.R., TIPPETTS, A.S. and BRANCH, D.G., 1993, Cocaine in the hair of mother infant pairs: quantitative analysis and correlations with urine measures and self reports. *Am. J. Drug Alcohol Abuse,* **19,** 159–175.
MARSH, D.O., MYERS, G.J., CLARKSON, T.W., AMIN-ZAKI, L., AL-TIKRITI, S., MAJEED, M.A. and DABBAGH, A.R., 1981, Dose response relationship for human exposure to methylmercury. *Clin. Toxicol.,* **18,** 1311–1318.
MARTINEZ, F., POET, T.S., PILLAI, R., ERICKSON, J., ESTRADA, A.L. and WATSON, R.R., 1993, Cocaine metabolite (benzoylecgonine) in hair and urine of drug abusers. *J. Anal. Toxicol.,***17,** 138–142.
MARTZ, R., DONNELLY, B., FETTEROLF, D., LASSWELL, L., HIME, G.W. and HEARN, W.L., 1991, The use of hair analysis to document a cocaine overdose following a sustained survival period before death. *J. Anal. Toxicol.,* **15,** 279–281.
MIECZKOWSKI, T. and NEWEL, R., 1993, An evaluation of patterns of racial bias in hair assays for cocaine: black and white arrestees compared. *Forens. Sci. Int.,* **63,** 85–98.
MIKI, A., KELLER, T., REGENSCHEIT, P., DIRNHOFER, R., TSTSUNO, M., KATAGI, M., NISHIKAWA, M. and TSUCHIHASHI, H., 1997, Application of ion mobility

spectrometry to the rapid screening of methamphetamine incorporated in hair. *J. Chromat. B.,* **692,** 319– 328.
MIYAZAWA, N. and UEMATSU, T., 1992, Analysis of ofloxacin in hair as a measure of hair growth and as a time marker for hair analysis. *Ther. Drug Monit.,* **14,** 525–528.
MIYAZAWA, N., UEMATSU, T., MIZUNO, A., NAGASHIMA, S. and NAKASHIMA, M., 1991, Ofloxacin in human head hair determined by high performance liquid chromatography. *Forens. Sci. Int.,* **51,** 65–77.
MOELLER, M.R., 1992, Drug detection in hair by chromatographic procedures. *J. Chromatogr.,* **580,** 125–134.
MOELLER, M.R., FEY, P. and SACHS, H., 1993, Hair analysis as evidence in forensic cases. *Forens.Sci. Int.,* **63,** 43–53.
NAGAI, T., SATO, M., NAGAI, T., KAMIYAMA, S. and MIURA, Y., 1989, A new analyticalmethod for stereoisomers of methamphetamine and amphetamine and its application to forensic toxicology.*Clin. Biochem.,* **22,** 439–442.
NAKAHARA, Y., OCHIAI, T. and KIKURA, R., 1992a, Hair analysis for drugs of abuse. V. The facility in incorporation of cocaine into hair over its major metabolites, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester. *Arch. Toxicol.,* **66,** 446–449.
NAKAHARA, Y., SHIMAMINE, M. and TAKAHASHI, K., 1992b, Hair analysis for drugs of abuse. III. Movement and stability of methoxyphenamine (as a model compound methamphetamine) along hair shaft with hair growth. *J. Anal. Toxicol.,* **16,** 253–257.
NAKAHARA, Y., TAKAHASHI, K., SHIMAMINE, M. and SAITOH, A., 1992c, Hair analysis for drugs of abuse. IV. Determination of total morphine and confirmation of 6-acetylmorphine in monkey and human hair by GC/MS. *Arch. Toxicol.,* **66,** 669–674.
NAKAHARA, Y., TAKAHASHI, K., SHIMAMINE, M. and TAKEDA, Y., 1991, Hair analysis for drug abuse. I. Determination of methamphetamine and amphetamine in hair by stable isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry method. *J. Forens. Sci.,* **36,** 70–78.
NAKAHARA, Y., TAKAHASHI, K., TAKEDA, Y., KONUMA, K., FUKUI, S. and TOKUI, T., 1990, Hair analysis for drug abuse. Part II. Hair analysis for monitoring of methamphetamine abuse by isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry. *Forens. Sci. Int.,* **46,** 243–254.
NATION, J.R., BOURGEOIS, A.E., CLARK, D.E. and HARE, M.F., 1983, The effects of chronic cobalt exposure on behavioral metallothionein levels in the adult rat. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.,* **5,** 9–15.
NATION, J.R., HARE, M.F., BAKER, D.M., CLARK, D.E. and BOURGEOIS, A.E., 1985, Dietary administration of nickel: effects on behavior and metallothionein levels. *Physiol. Behav.,* **34,** 349–353.
NIWAGUCHI, T., SUZUKI, S. and INOUE, T., 1983, Determination of methamphetamine levels in hair after single and repeated administration to rat. *Arch. Toxicol.,* **52,** 157–164.
OBARA, K., SAITO, T., SATO, H., YAMAKAGE, K., WATANABE, T., KAKIZAWA, M.,

TSUKAMOTO, T., KOBAYASHI, K., HONGO, M. and YOSHINAGA, K., 1991, Germaniumpoisoning: clinical symptoms and renal damage caused by long term intake of germanium. *Jpn J. Med.,* **30,** 67–72.
OFFIDANI, C., CARNEVALE, A. and CHIAROTTI, M., 1989, Drugs in hair: a new extraction procedure. *Forens. Sci. Int.,* **41,** 35–39.
OFFIDANI, C., STRANO ROSSI, S. and CHIAROTTI, M., 1993a, Drug distribution in the head, axillary and pubic hair of chronic addicts. *Forens. Sci. Int.,* **63,** 105–108.
OFFIDANI, C., STRANO ROSSI, S. and CHIAROTTI, M., 1993b, Improved enzymatic hydrolysis of hair. *Forens. Sci. Int.,* **63,** 171–174.
PIROZHKOV, S.V., WATSON, R.R. and ESKELSON, C.D., 1992, Gas chromatographic detection of cocaine and cocaethylene in hair of mice chronically injected with cocaine or cocaethylene and fed alcohol. *Forens. Sci. Int.,* **57,** 99–107.
POET, T.S., MARTINEZ, F. and WATSON, R.R., 1992, Effect of murine retroviral infection on hair and serum levels of cocaine and morphine. *Forens. Sci. Int.,* **54,** 29–38.
PÖTSCH, L. and MOELLER, M.R., 1996, On pathways for small molecules into and out of human hair fibers. *J. Forens. Sci.,* **41,** 121–125.
PÖTSCH, L., SKOPP, G. and MOELLER, M.R., 1997, Biochemical approach on the conservation of drug molecules during hair fiber formation. *Forens. Sci. Int.,* **84,** 25–35.
PUSCHEL, K., THOMASCH, P. and ARNOLD, W., 1983, Opiate levels in hair. *Forens. Sci. Int.,* **21,** 181–186.
RUNNE, U., OCHSENDORF, F.R., SCHMIDT, K. and RAUDONAT, H.W., 1992, Sequential concentration of chloroquine in human hair correlates with ingested dose and duration of therapy. *Acta Derm. Venereal. Stockh.,* **72,** 355–357.
SACHS, H., 1997, History of hair analysis. *Forens. Sci. Int.,* **84,** 7–16.
SACHS, H., DENK, R. and RAFF, I., 1993, Determination of dihydrocodeine in hair of opiate addicts by GC/MS. *Int. J. Legal Med.,* **105,** 247–250.
SKOPP, G., PÖTSCH, L. and MOELLER, M.R., 1997, On cosmetically treated hair—aspects andpitfalls of interpretation. *Forens. Sci. Int.,* **84,** 43–52.
SMITH, F.P. and LIU, R.H., 1986, Determination of cocaine metabolite in perspiration stain, menstrual bloodstain and hair. *J. Forens. Sci.,* **31,** 1269–1273.
SPRINGFIELD, A.C., CARTMELL, L.W., AUFERHEIDE, A.C., BUIKSTRA, J. and HO, J., 1993, Cocaine and metabolites in the hair of ancient Peruvian coca leaf chewers. *Forens. Sci. Int.,* **63,** 269–275.
STEWART-PINKHAM, S.M., 1989, The effect of ambient cadmium air pollution on the hair mineral content of children. *Sci. Total Environ.,* **78,** 289–296.
TAGLIARO, F., ANTONIOLI, C., MORETTO, S., ARCHETTI, S., GHIELMI, S. and MARIGO, M., 1993, High sensitivity, low cost methods for determination of cocaine in hair: high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Forens. Sci. Int.,* **63,** 227–238.
TRACQUI, A., KINTZ, P. and MANGIN, P., 1992a, Fatal poisoning involving amitriptyline: toxicologic data. *J. Toxicol. Clin. Exp.,* **12,** 3–9.

TRACQUI, A., KREISSIG, P., KINTZ, P., POULIQUEN, A. and MANGIN, P., 1992b, Determination of amitriptyline in the hair of psychiatric patients. *Hum. Exp. Toxicol.,* **11,** 363–367.

UEMATSU, T., MATSUNO, H., SATO, H., HIRAYAMA, H., HASEGAWA, K. and NAKASHIMA, M., 1992, Steady state pharmacokinetics of haloperidol and reduced haloperidol in schizophrenic patients: analysis of factors determining their concentrations in hair. *J. Pharm. Sci.,* **81,** 1008–1011.

UEMATSU, T., NAKANO, M., AKIYAMA, H. and NAKASHIMA, M., 1993, The measurement of a new antimicrobial quinolone in hair as an index of drug exposure. *Br. J. Clin. Pharmacol.,* **35,** 199–203.

UEMATSU, T. and SATO, R., 1990, Human scalp hair as evidence of individual dosage history of haloperidol: long term follow up study. *Ther. Drug Monit.,* **12,** 582–583.

VALENTE, D., CASSINI, M., PIGLIAPOCHI, M. and VANSETTI, G., 1981, Hair as the sample in assessing morphine and cocaine addiction. *Clin. Chem.,* **27,** 1952–1953.

VAN WOUWE, J.P., DE-WOLFF, F.A. and VAN GELDEREN, H.H., 1986, Zinc in hair and urine of paediatric patients. *Clin. Chim. Acta,* **155,** 77–82.

VIALA, A., DETURMENY, E., AUBERT, C., ESTADIEU, M. DURAND, A., CANO, J.P. and DELMONT, J., 1983, Determination of chloroquine and monodesethylchloroquine in hair. *J. Forens.Sci.,* **28,** 922–928.

WELCH, M.J., SNIEGOSKI, L.T. and ALLGOOD, C.C., 1993, Interlaboratory comparison studies on the analysis of hair for drugs of abuse. *Forens. Sci. Int.,* **63,** 295–303.

WINTERBERG, B., BERTRAM, H., ROLF, N., ROEDIG, M., KISTERS, K., REMMERS, S., SPIEKER, C. and ZUMKLEY, S., 1987, Differences in plasma and tissue aluminum concentrations due to different aluminum containing drugs in patients with renal insufficiency and with normal renal function. *Trace Elem. Electro. Health Dis.,* **1,** 69–72.

Cap. IV. Otrăvuri nevolatile. Otrăvirea cu metale

Există cinci grupe analitice de otrăvuri sau toxici: toxici gazoşi; toxici volatili; toxici minerali; toxici organici nevolatili; toxici speciali (după Ogier). Grupa a IV-a analitică conține toxicii organici nevolatili extractibili cu solvenți organici în mediul acid, neutru sau alcalin. Această grupă înglobează majoritatea (90%) compuşi naturali (vegetali sau animali) şi sintetici. In această grupă găsim substanțe cu caracter acid (acizi organici, derivați barbiturici, sulfamide, lactone, anhidride); heterozizi; metilxantine; medicamente de sinteză; alcaloizi; pesticide; aditivi alimentari; detergenți; toxine vegetale şi animale.

Separarea acestor substanțe în stare pură din diferite produse se realizează prin extragerea cu solvenți organici, după metode generale sau speciale. Unele dintre substanțe, cum ar fi nicotina, acidul picric, etc., pot fi izolate şi prin antrenare cu vapori de apă, operație care este de obicei urmată de extragerea distilatului cu solvenți organici.

Extragerea cu solvenți se bazează pe principiul după care solubilitatea substanțelor este invers proporțională cu masa moleculară. Se urmăreşte de regulă ca solventul să extragă toxicul nealterat, precipitând în acelaşi timp proteinele. Pentru a mări eficiența extractivă a solventului se adaugă acizi sau baze. Spre deosebire de izolarea toxicilor volatili şi minerali, extragerea toxicilor organici cu solvenți prezintă o serie de dificultăți suplimentare, precum:

- concomitent cu toxicul se por extragere şi unii produşi ce deranjează analiza (proteine, lipide, coloranți, metaboliți proprii etc.);
- se poate pierde o parte din toxic prin: oxidare; extracție incompletă; adsorbție pe precipitatele din cursul operațiilor de purificare etc.

Metodele de extracție se pot clasifica în funcție de:

1. *Solvenții folosiți*:

- alcool acidulat (pentru majoritatea toxicilor):
- extracția selectivă (cu solvenți specifici toxicului respectiv).

2. *Eficiența extragerii*

- extracție prin echilibrare;
- extracție exahusivă.

Extracția generală cu alcooli acidulați

Prima metodă eficientă de extragere cu solvenți organici a fost elaborată de State (1850). Ulterior metoda a fost ameliorată de Otto, apoi Orgier. În prezent se utilizează metoda Stas-Otto, modificată de Ogier şi Kohn-Abrest.

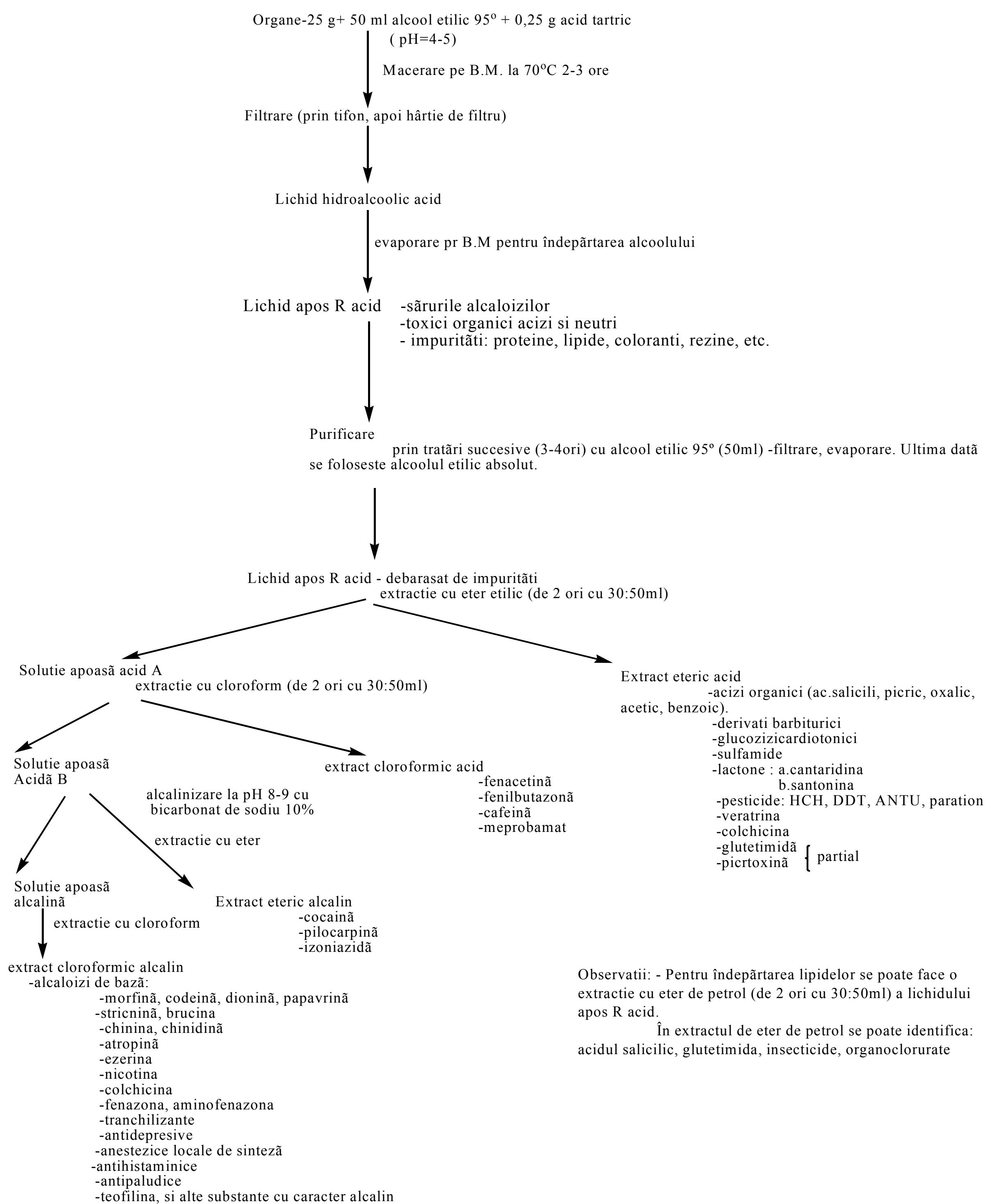
Metode de extracție

Metoda State se bazează pe principiul solubilității în apă, alcool sau amestec hidroalcoolic, a sărurilor alcaloizilor cu acid tartic sau oxalic şi a insolubilității lor în solvenți organici. Aceste săruri sunt descompuse cu bicarbonat de sodiu, când alcaloizii trec în forma bazică, insolubilii în apă, dar extractibili cu solvenți organici.

Metoda Stas – Otto: extragerea cu eter din lichidul apos acid a toxicilor cu caracter acid şi neutru. Sunt extraşi acizi organici, glicozizi, derivaţi barbiturici, metilxantinele, sulfamidele, pesticidele, lactone, anhidride, compuşi neutri, precum şi o serie de impurităţi.

Metoda Stas - Otto – Origer: Întrucât în variantele anterioare se obțin reziduuri impurificate cu proteine, lipide, coloranţi, rezine, Origer a purificat inițial filtratul hidroalcoolic acid prin tratarea acestuia cu alcool concentrat, agent precipitant al impurităților menționate.

Metoda Stas – Otto, modificată Metoda Stas – Otto: Pentru izolarea toxicilor, materialul biologic de analizat se împarte in două porţiuni: pe prima porţiune se execută reacţii preliminare, iar cea de a două se divide în trei porţiuni (A, B, C), în care se cercetează toxicii şi anume: în prezenţa A- toxicii volatili şi minerali, în prezenţa B- toxicii organici, iar în porţiunea C este utilizată pentru cercetări complementare.



Modul de lucru: Proba biologică de analizat (50-500 g) în funcție de natura acesteia, se omogenizează prin pulverizare, solubilizare sau suspendarea acestuia într-o cantitate mică de apă. În cazul conținutului stomacal, acesta este titrat în mojar cu puțină apă caldă. Se adaugă la proba omogenizată un volum dublu de alcool de 95° şi acid tartric în cantitate de 1% față de produs, astfel încât pH-ul să fie acid (pH-ul=4-5) (Schema nr.1). Nu folosesc acizi minerali, deoarece aceste impurifică produsul de analizat cu albuminații solubili şi determină hidroliza unor alcaloizi (cocaină, atropină). Se macerează 6-12 ore pe B.M. la 50°, 3-6 ore la

70°C sau 1-2 zile la temperatura laboratorului. Dacă produsul de analizat a conţinut apă-cazul organelor – masa macerată are o concentraţie alcoolică finală de aproximativ 70°, din cauza ieşirii apei din produs.
Se stoarce totul printr-un tifon şi se filtrează.

Filtratul este distilat sub presiune redusă sau este evaporat pe baie de apă la o temperatură sub 40°, până la consistenţa siropoasă, apoi se răceşte. Proba se tratează, agitând continuu, cu 3-4 ori volumul său cu alcool de 95°, se lasă să se aglomereze precipitatele floconoase proteice, apoi se filtrează. Filtratul este spălat cu alcool, care se adaugă la filtrat. Filtratul este din nou distilat, apoi tratat cu alcool de 95° şi filtrat. Purificarea prin tratare cu alcool este repetată de 3-4 ori. Ultima dată se foloseşte alcool absolut. Purificarea este completă atunci când la adăugare de alcool absolut nu se mai observa formare de flocoane proteice. Lichidul obţinut se concentrează pe B.M. până la consistenţă siropoasă apoi se diluează cu apă la 50 ml. Se obţine astfel lichidul apos R acid purificat. El conţine majoritatea toxicilor sub formă de tartraţi (alcaloizi) sau sub formă liberă (glucozizi, barbiturice, acizi organici etc.). Toxicii sunt extraşi din lichidul apos R acid, in mediul acid sau alcalin, după natura toxicului, cu eter acid sau cloroform. În lipsa indicaţiilor asupra naturii toxicului se procedează la extracţii succesive atât în mediul acid, cât şi în mediul alcalin. Dacă lichidul apos R este uşor opalescent – din cauza impurităţilor lipidice – nu trebuie filtrat, pentru a nu se antrena şi o parte din toxicii fixaţi prin absorbţie pe microprecipitat.

Extracţia eterică acidă: Se aduce cantitativ lichidul apos R acid într-o pâlnie de separare se verifica dacă pH-ul este acid şi se adaugă eter de petrol (30 ml). Se repetă extragerea de 3 ori. Operaţia serveşte pentru eliminarea restului de impurităţi din produs. Extractul de eter de petrol poate conţine acid salicilic glutetimidă, insecticide organoclorurate. Se evaporă extractele neunite de eter de petrol pe câteva sticle de ceas şi se cercetează prezenţa substanţelor menţionate. Lichidul apos acid rămas este extras apoi cu eter etilic, operaţia se repetă de 3 ori sau câte 20, 30 şi 50 ml. La agitarea pentru separarea straturilor trebuie să se evite formarea emulsiilor, dacă totuşi ele sau format, se sparg prin centrifugare, filtrare pe sulfat de sodiu anhidru sau adăugare de eter de petrol (sau alcool amilic). Extractul eteric, denumit *eter acid*, poate conţine: derivaţi barbiturici; glucozizi cardiotonici; lactone şi derivaţi; acizi organici; metilxantine (parţial); colchicină şi veratrină (parţial); pesticide etc. Extractele reunite de eter etilic sunt evaporate pe câteva sticle de ceas. Este preferabil ca evaporarea să se execute la un ventilator cu curent de aer cald, la o sursă de raze infraroşii sau pe baie de apă electrică. Dacă reziduurile sun pure, se purifică prin recristalizare din apă sau solvenţi adecvaţi sau prin microsublimare, precum şi reacţiile de identificare a toxicilor menţionaţi.

Extracţia eterică alcalină: Lichidul apos acid rămas de la extracţia acidă cu eter etilic este adus la pH-8 cu carbonat acid de sodiu 10% sau uneori cu amoniac 10% şi extras de trei ori cu eter etilic. Extractul eter etilic, denumit *eter alcalin* poate conţine; alcaloizii (cu excepţia morfinei şi a unei părţi din stricnină); alte substanţe organice, naturale sau de sinteză. Eterul

alcalin este evaporat pe sticle de ceas. Dacă reziduurile nu sunt pure, se dizolvă în HCl 0,1 N şi se extrag cu eter, care îndepărtează impuritățile. Soluția apoasă rămasă este alcalinizată cu carbonat acid de sodiu şi extrasă din nou cu eter, care se evaporă pe câteva sticle de ceas.

Extracția cloroformică alcalină: Lichidul apos R alcalin rămas poate conține morfină şi o parte den stricnină, precum şi teobromină şi teofilina. Pentru ale separa din lichidul apos R alcalin se execută o extracție suplimentară cu cloroform care se evaporă pe sticle de ceas, se concentrează substanțele menționate.

Extracția prin echilibrare: Metoda se bazează pe agitarea produsului de analizat cu o cantitate anumită de solvent, când se realizează un echilibru de repartiție a toxicului între substrat (produsul de analizat) şi solvent – deci un echilibru între reținerea toxicului în substrat şi extragerea lui în solvent. Din lichidul de extracție, ajuns la echilibru, se determină toxicul.

Extracția exhausivă: Metoda se bazează pe epuizarea pe epuizarea produsului de analizat cu solvent mereu proaspăt, operația repetându-se până la extragerea completă. Se poate folosi următoarele procedee: extracție cu solvent care recirculă (în aparat Soxhler, Kumanawa etc.); extracție cu solvent care se reînnoieşte (pâlnia de separare).

Alte tehnici de izolare

Metoda Florence: Toxicii sunt solubilizați în apă prin trecere cu acid tricloracetic 20% care participă în acelaşi timp proteinele. Filtratul apos acid este epuizat apoi cu solvenți organici în mediu acid şi în final alcalinizat. Metoda este rapidă şi uşor de executat, însă prezintă dezavantajul absorbției parțiale a toxicilor cercetați de către coagul, ca şi a alterării unor glicozizi şi alcaloizi datorită acidității puternice.

*Metoda proteolizei (Fabre):*Produsul este supus degradării enzimatice cu tripsină, când se solubilizează proteinele. Lichidul este apoi extras cu solvenți organici.

Metoda electrodializei (Dhèrė-Fabre): Produsul acidulat este supus electrolizei întru-dispozitiv special; sunt astfel separați şi ionii minerali, alături de cei organici. Metoda este folosită pentru extragerea barbituricilor şi alcaloizilor, însă necesită uneori o modificare suplimentară a dispozitivului, pentru a evita degradarea toxicului.

Metoda cu tungatat de sodiu (Valov): Precipitarea substanței organice se realizează prin tratarea cu tungatat de sodiu şi apoi încălzire, urmată de filtrare şi extragere cu solvenți organici. Metoda este deosebit de utilă pentru substanțele cu caracter acid sau neutru.

Metoda cu sulfat de amoniu (Nicolle): Produsul de analizat este acidulat cu HCl, apoi saturat cu sulfat de amoniu şi încălzit la 90°. Filtratul răcit este epuizat cu solvenți organici. Metoda este utilizabilă pentru orice material-organe, sânge, alimente, băuturi.

Metoda digestiei acide: Produsul de analizat acidulat cu HCl este încălzit pe baie de apă timp de o oră, când precipitând proteinele. Filtratul este extras cu solvenți organici. Metoda este recomandată pentru fenotiazine, chinină, morfină, etc., pe care le separă din complexul drog-proteină. În schimb, este inutilizabillă pentru atropină, aconitină, cocaină, benzodiazepine, paracetamol, pe care le hidrolizează.

Metoda cu sulfat de sodiu anhidru (Griffon-Le Breton): Lichidele biologice sunt acidulate sau alcaline – în raport de natura substanței-apoi tratate cu sulfat de sodiu anhidru până obținerea unei mase pulverulente, care se epuizează cu solvenți organici. Metoda este rapidă şi utilă pentru extragerea barbituricilor şi a unor alcloizi.

Metode directe (izolare prin cromatografie cu răşini schimbătoare de ioni): Unele medicamente ca antihipertensive, colinergice, insulina etc. Sunt extrase din sânge şi urina direct prin cromatografia produsului acidulat cu ajutorul unei coloane cu răşini schimbătoare de ioni.

Identificarea şi determinarea toxicilor organici nevolatili

Alcaloizii

Identificarea alcaloizilor se face curent cu reactivi generali care dau precipitate sau produşi colorați cu cantități mici de alcaloid. Reacția de identificare cu reactivi generali se execută pe o soluție clorhidrat sau sulfat de alcaloid, astfel: reziduul rămas pe sticla de ceas după evaporarea eterului (cloroformului, dicloretanului etc.) alcalin este reluat cu câteva picături de acid clorhidric diluat sau acid sulfuric diluat şi se evaporă la sec pe B.M. Reziduul, care reprezintă alcaloidul salifiat, se solvă în 3-4 picături din reactivul general. În prezența alcloizilor , poate apărea opalescență, un precipitat sau zone colorate.

Este necesar ca reacțiile generale ale alcaloizilor să fie executate pe reziduuri de alcaloizi lipsite de impurități proteice, care interferă reacția, dând şi ele precipitate cu reactivi generali ai alcaloizilor.

Reactivii generali ai alcaloizilor se împart în:
A.- reactivi de precipitare;
B.- reactivi speciali de culoare.

Reactivi de precipitare

În raport cu compoziția chimică, reactivii de precipitare ai alcloizilor se pot împărți, schematic, în patru grupe: 1. ioduri duble; 2. cloruri ale metalelor grele şi săruri duble; 3. heteropoliacizi; 4. pseudoacizi, acizi organici şi alți compuşi organici.

Ioduri duble

a. Reactivul Bourchardat (Wagner) (soluție de iod- iodurat, $KI.I_2$) 2 g de iod, 2 g iodură de potasiu se solvă în apă distilată 100 ml. . Reactivul Bourchardat_dă precipitate colorate cu toți alcaloizii salificați, cu excepția cafeinei. Precipitatele sunt solubile în exces de iodură de potasiu şi îi alcool. Reactivul se păstrază indefinit în sticle brune, bine închise (tab.1).
b. Reactiv Drangendorff (iodobismutat de potasiu, $K(BiI_4)H_2O$ 5 g subnitrat de bismut se solvă în 40 ml apă distilată la care se adaugă 10 ml acid clorhidric concentrat, apoi se adugă 100 ml iodură de potasiu 40%. Reactivul nu este stabil decât în mediul acid şi precipită prin diluare cu apă, precipitatul redizolvându-se prin acidulare. Prin şedere se eliberează iod, care se extrage prin agitare cu cloroform.
Reactiv Drangendorff dă cu alcaloizii clorhidrați precipitate amorfe, roşii-portocalii, solubile parțial prin încălzire şi reprecipitând la rece. Complecşii formați sunt solubili în cloroform, acetonă, acetat de etil, ciclohexanonă etc., soluțiile pretându-se la dozări colorimetrice.
c. Reativul Mamė (iodocadmiat de potasiu K_2 (CdI_4) 5 g iodură de cadmiu se dizolvă într-o soluție caldă de 10 g iodură de potasiu în 30 g apă, apoi se completează cu apă distilată la 110 ml.

Reactivul Mamė dă cu alcaloizii precipitate albe sau gălbui, solubile în exces de reactivi. Cafeina nu dă precipitat, iar atropina nu precipită decât în soluții destul de concentrate.
d. Reactivul Mayer (iodomercuriat de potasiu, K_2HgI_4) 13,52 g clorură mercurică, 48,8 g iodură de potasiu se dizolvă în 1000 ml apă distilată.
Reactivul Mayer dă cu alcaloizii precipitate albe până la galben deschis, amorfe sau cristaline.
d. Reactivul Walzer (iodomercuriat de potasiu)
Peste soluția de iodură de potasiu 10% se adaugă iodură de mercur solidă, până la saturare. Reactivul Walzer este varianta îmbunătățită a reactivului Mayer, fiind mai sensibil.
2.Cloruri ale metalelor grele şi săruri duble
a. Clorura de aur (soluție apoasă de diferite concentrații: 5%, 10%, 30%, 40%).
Aceste soluții dau precipitate de cloroaurați, de alcaloizi cu formula $Au\ Cl_3 \cdot HCl \cdot Alc.$ de culoare galbenă sau albă.
b. Clorură de platină (soluție apoasă 5%)
Dă precipitate de cloroplatinat de alcaloizi, cu formula $PtCl_4 \cdot 2HCl \cdot Alc.$
c. Clorura de mercur (soluție apoasă 5%) cloromercurați ai alcaloizilor, precipitate albe.
d. Sarea lui Reinecke $[Cr(NH_3)_2(SCN)_4 \cdot NH_4] \cdot H_2O$
Sarea Reinecke 4 g , apă distilată 100 ml.
Reactivul dă precipitate cu soluții clorhidrice de alcaloizi.
3.Heteropoliacizi
Heteropoliacizii dau precipitate cu alcaloizi; datorită masei lor moleculare mari se obțin precipitate abundente, care pot servi eventual şi pentru dozarea gravimetrică a alcaloizilor.
a. Reactivul Bertrand (acid silicotungetic) 5 g acid silicotungetic (sau sare de sodiu)se dizolvă în 100 ml apă distilată. Este cel mai sensibil dintre heteropoliacizi, datorită masei moleculare mari (aproximativ 2880).

Dă precipitate cu formula $SiO_2 \cdot 12\ TuO_3 \cdot 2H_2O \cdot 4$ Alc.+ nH_2O. Complexul este descompus la rece de alcalii, cu eliberare de alcaloid, care poate fi extras cu un solvent organic. Reactivul Bertrand precipită cu unele substanțe proteice şi cu glicogenul, nu însă cu glicoizii, taninul şi cianurile.

b. Rectivul Scheilber (acid foafotungatic)

Se solvă 4 g tugetat de sodiu în 20 ml apă, apoi se adaugă 1 g acid fosforic 50% . Reactivul dă precipitate albe cu alcaloizi.

c. Reactivul Schultze (acid fosfoantixonic)

3 g corură de stibiu, 9 g fosfat acid de sodiu se dizolvă în 100 ml apă distilată. Dă precipitate albe cu alcaloizi.

d. Reactivul Sonnenschein (acid fosfomolibdenic)

În lipsă de substanță pură, reactivul se precipită astfel: se precipită o soluție nitrică de molbdat de amoniu cu o soluție de fosfat disodic. Precipitatul galben se filtrează la pompa de vid, apoi se dizolvă într-o cantitate suficientă de hidroxid de sodiu. Soluția se încălzeşte pe o baie de nisip până la îndepărtarea completă a amoniacului. Cu substanța obținută se prepară o soluție de 10% în acid azotic 10%.

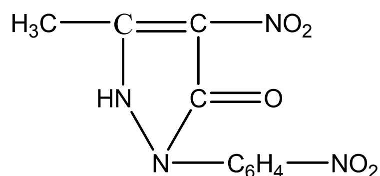
Reactivul Sonnenschein dă precipitate cu alcaloizii şi cu substanțele înrudite (anilină substituită, alte amine etc.).

4. Pseudoacizi, acizi şi alți compuşi organici

a. Reactivul Hager (acid picric, soluție saturată)

Soluțiaapoasă saturată (10%) de acid picric dă precipitate galbene, uşor solubile la cald, care reprecipită la rece. Unele cristale au forme caracteristice. Următoarea variantă a reactivului propusă de Ionescu Matiu permite obținerea mai uşoară a cristalelor caracteristice: la soluția saturată de acid picric în alcool de 95° se adaugă glicerină în proporție de 5%.

b. Rectivul Knorr (acid picrolonic: 1-p-nitrofenil, 3-metil 4-nitro 5-pirazolină.)

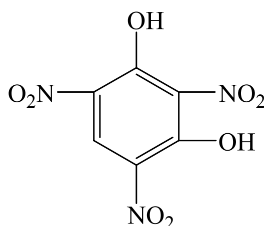


Se prepară o soluție de acid picrolonuc cu 2% în alcool (soluție saturată), care dă cu alcaloizii, precipitate galbene sau roşii, care se descompun la cald.

d. Acidul tanic (tanin)

Taninul dă precipitate de tanați de alcaloizi. Specificitatea reactivului este redusă, deoarece taninul dă precipitate şi cu alți produşi (substanțe proteice). Complexul tanin-alcaloid este descompus de oxidul de plumb.

d.Acidul stifnic (2,4,6-trinitrorezorcină).



Soluția apoasă saturată de acid stifnic dă precipitate cu alcloizii.

Reactivi de culoare speciali pentru alcaloizi

După stabilirea prezenței alcaloizilor cu ajutorul reactivilor generali, se trece la caracterizarea unui alcaloid sau a unei grupe de alcaloizi prin culoarea obținută la tratarea cu reactivi speciali.

Reacțiile se execută cu alcaloizii nesalifiați şi sunt cu atât mai nete, cu cât reziduul este mai purificat; aceasta, deoarece cei mai mulți reactivi speciali sunt preparați cu acid sulfuric concentrat care carbonizează impuritățile, astfel încât colorația reactiv-alcaloid este interferată sau chir mascată. Reactivii speciali de culoare a alcaloizilor de împart în 3 grupe:

a. – acizi concentrați;

b. – amestec de acizi;

c. – amestec de acizi cu diferite săruri.

a. Acizi concentrați – acid sulfuric, acid azotic (lipsit de vapori nitroşi).

b. Amestec de acizi –reactivul Edrman. Se amestecă 20 ml acid sulfuric concentrat cu 10 picături dintr-o soluție de 8 picături acid azotic 25% şi apoi cu 100 ml apă distilată.

c. Amestec de acizi cu diferite săruri:

-reactivul Fröhde (acidul sulfomolibdenic) : 0,5 g, molibdat de amoniu 0,1 g (molibdat de sodiu) se dizolvă în 10 ml acid sulfuric concentrat. (Se prepară extemporaneu);

-reactivu Mandelin (sulfovanadat): 1g vanadat de amoniu se dizolvă în 200 ml de acid sulfuric concentrat;

-reactiv Lafon (sulfoselenit): 1 g selenit de sodiu se dizolvă în 20 ml acid sulfuric concentrat;

- reactivu Marke (sulfoselenit): 1 g selenit de sodiu se dizolvă în 20 ml acid sulfuric concentrat;

-reactivulMarquie (sulfoformolat): 1 ml formolat 40% se amestecă cu 30 ml acid sulfuric concentrat (se prepară extemporaneu);

-reactiv Wasicki (PABA în acid sulfuric concentrat): 2 g p-dimetilaminobenzoidă se dizolvă în 6 ml acid sulfuric concentrat şi 3 ml apă distilată.

Reacțiile obținute de alcaloizi cu acidul sulfuric concentrat, acidul azotic concentrat şi reactiv Erdman sunt redate în tabelul nr. 2.

Reacțiile de culoare cu aceşti reactivi sunt redate în tabelul nr. 3.

Tabelul 1.
Reacțiile alcaloizilor cu formare de precipitate (după Banciu)

ALCALOIDUL	REACTIV HAGER	REACTIV MAYER	REACTIV DRANGERDOFF	REACTV BOUCHARDAT
Aconitina	precipită nunai în soluție concentată	precipitat alb în soluții d diluate	precipitat galben (1 : 40000(x)	precipitat brun
Atropina	precipitat galben numai în soluții concentrate	(1:7000)	galben-roşcat, trece în galben intens (1:01000)	brun-roşcat (1:3000)
Cafeina	precipită numai în soluții concentrate	nu precipită	nu precipită	precipitat brun numai în soluții concentrate
Chinina	precipitat amorf (1:40000)	precipitat alb (1:125000)	precipitat roşu (1:50000)	roşu brun
Cocaina	precipitat galben (1 : 1000)	(1 : 140000)	-	precipitat brun (1 : 50000)
Codeina	precipitat galben (1 : 225)	(1 : 50000)	precipitat roşu (1:30000)	precipitat brun (1:60000)
Colcichina	precipită numai în soluții concentrate	precipită numai în soluții concentrate	(1:3000)	precipitat brun (1:25000)
Fizostigmina	precipită numai în soluții concentrate	precipitat alb (1: 5000)	precipită	precipitat brun roşcat (1:25000)
Morfina	nu precipită	(1:2500)	roşu - galben (1:5000)	brun - roşcat (1:25000)
Nicotina	precipitat	precipitat	ptecipitat roşu,	precipitat brun -

	galben numai în în soluții concentrate	alb (1:12500)	trece în alb -cenuțiu (1 : 40000)	roşcat (1:50000)
Papavelina	precipitat galben (1 : 500)	precipitat alb (1:15000)	precipitat roşu-portocaliu (1 : 10000)	precipitat roşu-închis (1 : 50000)
Pilocarpina	precipită	precipită	precipită	precipită
Srricnina	precipitat galben (1 : 20000)	precipitat alb (1:15000)	precipitat galben (1 : 25000)	precipitat brun - roşcat (1:50000)
Teobromina	nu precipită	nu precipită	-	precipitat brun numai în soluții concentrate

(x) = cifrele din paranteză reprezintă gradul de sensibilitate a reacției.

Tabelul 2.

Reacțiile alcaloizilor cu acizii cu formare de produse colorate

REACTIV DE CULOARE			
ALCALOID	H_2SO_4	HNO_3	R. Erdman
Atropina	-	-	-
Brucina	-	roşu-trece în galben	-
Chinina	fără culoare trece în gălbui şi la cald în brun	-	-
Cocaina	-	-	-
Codeina	lacald albastru- violet	galben-verzui	la cald albastru
Colcichicina	galben	violet,trece în brunroşcat : cu NOH trece în portocaliu	albastru,cu KOH trece în roşu
Heroina	-	galben, la cald trece în roşu	galben, verde pal albastru
Dionina	-	galben verzui	orange
Morfina	la cald ourpuriu	roşu orange trece în galben roşcat	roşu trece în brun
Nicotina	-	-	-
Papavelina	la cald volet-albastru	gălbui, trece în roşu - întunecat	albastru-verzui
Pilocarpină	-	Galben	-
Stricnină	Fără culoare,cu KOH	La cald trece în galben	-

	trece în galben		
Picrotozină	Galben pal	-	-

Tabelul 3

Reacții de culoare ale alcaloizilor cu reactivi speciali

REACTIVI DE CULOARE

Heroina Purpuriu Verde Violet Verde

Alcaloid R.Fröhde R.Mandelin R.Marquis R.Lafon R.Wasiky

roșcat, la cald trece în albastru-violaceu -

0 1 2 3 4 5

Atropina / Dionina — Verde, trece în albastru - ; Galben, trece la galben / Roșu, trece în cald în verde ; Albastru, la cald verde / Albastru, violet murdar ; Verde - ; Roșu - cireșiu, violet

Morfina / Brucina — Violet, trece în brun-verde / Roșu, în galben apoi în galben-brun ; Roșcat, trece în Albastru-violaceu / Roșu ; Roșu-carmin, trece în violet-albastru - ; Albastru, Verzui, la cald trece în brun / Galben, roșu, la cald brun (strălucitor) ; Roșu-

Chinina - - - - -

Cocaina / Nicotina — În timp alb-roscat - ; – ; - - ; Galben / În timp, roșu, la cald, - -

Papaverina — Verde, albastru, ; Verde, albăstrui, ; Rosu trece în orange ; Verde, albastru, portocaliu ; -

Codeina — Galben-rosu / La cald, verde murdar, la cald albastru - ; Verde / Albastru trece în albastru ; Roșu-carmin trece în Albastru-violaceu ; Verde cald / La cald, violet ; Roșu

Pilocarpina — Galben,verde, albastru ; În timp galbui, apoi roșcat ; - ; -

Colchina — Galben trece în galben verzui - ; Albastru-violaceu ; Galben citrin ; Galben citrin, la cald galben brun - ; -

Stricnina — - ; Violet, albastru verzui, trece în brun / trece în roșu ; În timp, la cald brun-verzui ; - ; - -

Picrotoxin — Galben-violaceu ; - ; - ; Roșu-violet

a

Determinarea cantitativă a toxicilor organici nevolatili

Spectrofotometria de absorbție în UV, Vis şi IR

În domeniul vizibil, valoarea absorbției luminii este apreciată prin intermediul extincției, care este definită pentru soluții, prin intermediul legii Lamoert – Beer după ecuația:

E= ε . C . 1

Relația arată că extincția, deci absorbția luminii este funcție de lungimea de undă λ (prin intermediul lui ε), de concentrația C, de grosimea stratului absorbant 1. Pentru a studia E_1 = f(c), trebuie ca ε(λ) şi 1 să se mențină constante. Aceasta se realizează practic, ținând λ = λ_{max} (valoarea lungimii de undă corespunzătoare maximului şi lucrând în cuve de grosime constantă. În aceste condiții, pentru o serie de soluții de concentrație C_1......C_n se vor detrmina extincțiile E_1.......E_n. Reprezentareagrafică trebuie săp fie o dreaptă. Se că legea Lambert – Beer se verifică în domeniul de concentrație C_1 – C_n, iar dreapta obținută se numeşte curbă etalon. Ea se foloseşte pentru determinarea oricărei concentrații necunoscute C_x.

În domeniul vizibil de reacții, absorb numai substanțele colorate ele vor absorbi din spectrul luminii din vizibil (400 – 800 nm) radiația complementară culorii ce o prezintă. Substanțele incolore nu absorb în vizibil. Pentru a putea studia dependența E = f(c) şi pentru această categorie de substanțe, se efectuează o reacție de culoare prin tratarea substanței incolore cu un reactiv de culoare. Sistemul obținut va absorbi în vizibil şi concentrația se va putea determina cantitativ în acest domeniu.

Concentrația probei de analizat se poate calcula prin metoda grafică sau metoda matematică.

<u>Metoda grafică</u>: se trasează curba etalon, reprezentând pe abcisă concentrația, iar pe ordonată extincția şi cunoscându-se extincția probei necunoscute se poate calcula concentrația.

<u>Metoda matematică</u>: se calculează factorul de pantă pentru fiecare eprubetă din scara etalon după relația:

F_p= C / E

în care:

C = concentrația în µg.

E = extincția în nm.

Apoi se calculează factorul de pantă mediu ca media artimetică a factorilor de pantă din scar5a etalon, iar concentrația probei necunoscute c_x este dată de relația:

C_x=F_p' x E_x

în care :

F_p' = factorul de pantă mediu;

E_x= extinc□ia probei de analizat

Determinarea spectrelor de absorbție în U.V. (200-¤00nm) şi I.R. (800-106 nm) constituie o cale rapidă de depistare şi chiar dozare a majorității toxicilor organici nevolatili, fie singuri, fie în amestec.
La determinările în U.V., pe lângă alura spectrului – punctele de absorbție maximă şi minimă- are importanță analitică şi coeficientul de extincție specifică, E(1%, 1 cm); trebuie de asemenea respectate condițiile de pH, solvent, concentrație, temperatură etc.
Spectrofotometria în I.R. poate fi practicată la determinarea substanțelor solide, lichide sau gazoase. Substanțele solide sunt incluse în discuri de halogenuri alcaline; se pulverizează într-un mojarde agat sau într-un vibrator cu bile, 1 mg substanță de cercetat şi 250 mg halogenură, apoi se comprimă sub formă de disc. Includerea se poate face în ulei de parafină sau hidrocarburi halogenate. Substanțele lichide sau solvite în solvenți (cloroform,sulfură de carbon, teracloură de carbon) sun aplicate sub formă de film pe materialul transparent fixat în fața aparatului. Substanțele gazoase sun determinate fie direct în spectrofotometrul în I.R, după o prealabilă separare prin gazocromatografie.

Cromatografia
Dintre diferite forme de cromatografie- pe hârtie, pe coloană, în strat subțire, în formă gazoasă-cromatografie pe stat subțire (CSS) este deosebit de utilă prin rapiditatea,sensibilitatea, capacitatea de separare a componentelor dintr-un amestec. Se folosesc diferite suporturi. În funcție de grupa de substanțe de analizat se utilizează diferite amastecuri de solvenți pentru migrare, care asigură obținerea unor Rf cât mai diferențiate. Pentru o mai bună separare a compuşilor apropiați structural, se recomandă uneori C.S.S. bidimensională. Relevarea (identificarea componentelor izolate) se realizează prin examinarea plăcii în lumină U.V. şi/sau prin pulverizarea cu diferiți reactivi, indicați pentru fiecare substanță sau grupe de substanțe.
Gazcromatografia este o metodă aplicabilă în special pentru separarea amestecurilor şi depistarea ulterioară prin detectarea conductibilității termice, detectarea ionizării (în flacără, captură de electroni, ionizare e argon). Metoda are o mare sensibilitate şi specificitate, însă necesită o aparatură complexă.

Teste biologice
Identificarea unor substanțe, în special a celor active în concentrații de ordinul microgramelor, dificilă şi chiar imposibilă prin metode uzuale, se realizează cu ajutorul testelor fiziologice. În acest scop, reziduul de la evaporarea solventului este administrat la animalele sau organe izolate, urmărindu-se efectele fiziologice caracteristice (midrează, convulsii etc.)

Otrăvirea cu metalele grele

Oamenii pot veni în contact cu metalele grele în munca industrială, industria farmaceutică sau agricultură. Copiii pot fi otrăviti, jucandu-se cu solul contaminat. Intoxicația cu plumb la adulți a fost descoperită la utilizarea glazurii pe bază de plumb de pe vasele de ceramică

folosite pentru alimente. Există şi contaminarea cu remedii pe baza de plante. Arsenul şi taliul au fost amestecate cu alimente sau băuturi pentru sinucidere sau pentru a-i otrăvi pe alții.

Următoarele nouă elemente sunt toxice: aluminiu, antimoniu, arseniu, bismut, cadmiu, plumb, mercur, nichel, staniu. Pentru determinarea concentrației lor se poate folosi firul de păr deoarece acesta acumulează metalele grele. Toxicitatea metalelor grele sau otrăvirea apare atunci când organismul acumulează o cantitate excesivă dintr-un metal greu, cum ar fi mercur, plumb, arsen, cadmiu, nichel sau aluminiu, expunând astfel individul îmbolnăvire gravă sau moarte.

Aceste metale grele nu joacă în corpul uman niciun rol biologic cunoscut, spre deosebire de unele microelemente, cum ar fi seleniu, care este un antioxidant eficient, de fier, care este necesar celulelor sanguine sau de cupru, care este o parte integrantă a multor enzime. Din moment ce aceste metale nu sunt utile organismului, şi pentru că organismul are posibilitatea de a le stoca, aceste metale grele se pot acumula în țesuturi în timp sşi pot provoca probleme grave de sănătate.

Dacă apar simptome de otrăvire cu metale grele, trebuie testat corpul cu metode analitice cum ar fi prin microanaliză colorimetrică sau prin spectrofotometrie de absorbție atomica. In cazul determinării unui anumit grad de toxicitate, se recurge la o îndepărtare a metalului greu prin tratament cu chelatori sau se adresează unui medic.

Totuşi, o serie de simptome de intoxicare cu plumb sau mercur se pot intalni şi în alte circumstanțe care nu au nimic în comune cu toxicitatea caracteristică metalelor grele. Aceste simptome generale includ o combinație de oboseală prelungită şi confuzie mentală sau lipsă de concentrare.

Aşadar doar oboseala sau problemele de concentrare mentală nu sunt suficiente pentru a suspecta otrăvirea cu grele metale.

Unele dintre metalele grele toxice, cum ar fi plumb, mercur, aluminiu, sunt suspectate în orice scădere notabilă în abilitățile motorii şi echilibrului. Totuşi, dacă corpul devine mai greoi şi dezechilibrat, şi aceată stare dureaza un timp, poate fi exclusă intoxicația cu metale grele.

Problemele de echilibru şi/sau scăderea abilitatilor motorii sunt mai rare decât oboseala sau starea de confuzie mentală şi pot indica alte afecțiuni medicale în afară de intoxicația cu metale grele. De aceea, trebuie depistate simptomele specifice de intoxicație cu metale grele.

Simptomele generale a intoxicației cu metalele grele

Otrăvirea cu metale grele poate pune viața în pericol, deci este foarte important sa se facă teste medicale dacă există simptome severe de toxicitate cu metale grele, cum ar fi afectarea capacității de a merge, greață severă sau alte simptome importante.

Trebuie găsite metalele prezente în corp şi determinată concentrația lor pentru a stabili cel mai bun curs de acțiune pentru detoxifierea de metale grele din sistem.

Deoarece primele simptome de toxicitate cu metale grele pot fi, de asemenea, simptome ale altor afecțiuni, este vital să se facă teste adecvate, timpuriu, înainte ca

simptomele să se agraveze. Analiza părului poate arăta exact substanțele nocive şi, apoi, poate fi pusă în aplicare detoxifierea adecvata de metale grele.

Multi oameni au devenit alertați de toxicitatea mercurului. Insă şi argintul coloidal este toxic, deşi este un antiseptic şi a fost folosit inca din antichitate pentru a inhiba bacteriile din apa de băut. În cazul în care otrăveşte germenii, va otrăvi şi omul. Fierul formează cei mai distructivi radicali liberi şi este astfel este foarte dăunator pentru viață.

Deoarece toate metalele sunt toxice, corpurile noastre necesită mecanisme speciale de transport şi manipulare pentru a le împiedica să ne otrăvească. Acest lucru se aplică şi la mineralele esențiale, cum ar fi fierul, zincul şi cromul sau neesențiale şi metaloizi, cum ar fi cadmiul şi compuşii cu arsen.

Intoxicația cu metale grele

Intoxicatia cu metale grele reprezintă acumularea toxică de metale grele în țesuturile moi ale corpului. Cel mai frecvent implicate în intoxicații accidentale şi otrăviri sunt plumbul, mercurul, arsenul şi cadmiul. Mai recent, taliul a atras atenția în mass-media drept otravă utilizată în cazuri de crimă din anii '90. Unele metale grele, cum ar fi zincul, cuprul, cromul, fierul şi manganul, sunt necesare organismului în cantități mici, dar aceleaşi elemente pot fi toxice în cantități mai mari.

Metalele grele pot intra în organism prin alimente, apă, aer sau prin absorbție prin piele. Odată ajuns în organism, concurează şi înlocuiesc mineralele esentiale, cum ar fi zinc, cupru, magneziu şi calciu, şi interferă cu funcțiile organelor. O formă de otrăvire cu mercur, frecventă în Statele Unite, este auto-injectarea mercurului sub piele. Unii boxeri injectează ei înşişi mercur, în credința că le crşte masa musculară. Mercurul metalic, de asemenea, este utilizat în medicina populară sau în ritualuri religioase în diferite culturi. Aceste practici cresc riscul de otrăvire cu mercur a copiilor din aceste grupuri etnice sau subculturi.

Cauze şi simptome

Simptomele variază, în funcție de natura şi cantitatea de metale grele ingerate. Pacienții se pot plânge de greață, vărsături, diaree, dureri de stomac, dureri de cap, transpirații şi un gust metalic în gură. În funcție de metal, pot fi linii albastre-negre în țesuturile moi. În cazurile severe, pacienții prezintă afecțiuni evidente cognitive, motorii şi incompetențe lingvistice. Expresia *nebun la cap* vine de la otrăvirea cu mercur răspândită în secolul al 17-lea in Franța, printre confecționerii de pălării care îmbibau pielea de animale într-o soluție de azotat de mercur pentru a-i înmuia părul.

Diagnostic

Intoxicatia cu metale grele poate fi detectată utilizand teste de sânge şi urină, analize de păr şi țesuturi, sau raze x. Diagnosticul este adesea trecute cu vederea, cu toate acestea, deoarece multe dintre simptomele precoce de intoxicatii cu metale grele sunt nespecifice. Medicul ar trebui să ia o istorie amănunțită a pacientului cu ocuparetiaa pacientului.

În copilărie, nivelul de plumb din sânge de peste 80 ug/dL indica, în general, intoxicatie cu plumb, cu toate acestea, nivelurile semnificativ mai reduse (> 30 ug / dl) pot provoca retardare mentala si alte probleme cognitive si comportamentale la copiii afectați.

Centrele pentru Controlul si Prevenirea Bolilor consideră că un nivel de plumb din sange de 10 ug / dl sau mai mare la copii este un motiv de îngrijorare. La adulți, simptomele otrăvirii cu plumb, de obicei, sunt observate atunci cand nivelul de plumb din sânge depăşeste 80 ug / dl pentru un număr de săptămâni.

Nivelul de mercur in sange nu trebuie să depăşească 3.6 ug / dL, in timp ce nivelul din urina nu trebuie să depăşească 15 ug / dl. Simptomele de otrăvire cu mercur pot fi văzute atunci când nivelul de mercur depăşeşte 20 ug / dl în sânge şi de 60 ug / dL în urină. Nivelul de mercur in par poate fi folosite pentru a masura gradul de severitate al expunerii cronice la mercur.

Deoarece arsenul este rapid eliminat din sânge, nivelul de arsen din sânge nu poate fi foarte utilă în diagnostic.

Arsenul în urină (măsurat într-o colecție de 24 de ore urmat de 48 de ore fara a manca fructe de mare) pot depăşi 50 ug / dl la persoanele cu otravirea cu arsen.

Daca se suspecteaza o intoxicației acută cu arsen sau taliu, o analiza de raze x poate dezvălui aceste substanțe la nivelul abdomenului (deoarece ambele metale sunt opace la razele X). Arsenul poate fi, de asemenea, detectate în păr şi unghii de luni de zile ca urmare a expunerii.

Toxicitatea cadmiului este în general, indicata atunci cand nivelul creatininei din urină depăşeşte 10 ug / dl si nivelurile sanguine depăşesc 5 ug/dl.

Intoxicația cu taliu cauzeaza adesea caderea parului (alopecie), amorțeală, şi o senzație de arsură la nivelul pielii, precum şi greață, vărsături şi amețeli. 15-20 mg de taliu per kilogram de greutate corporală este fatala la om, cu toate acestea, cantitati mici pot provoca leziuni severe la nivelul sistemului nervos.

Tratament

Atunci când este suspectata intoxicatia cu metale grele, este important să se înceapă un tratament cât mai curând posibil pentru a minimiza daunele pe termen lung a sistemului nervos al pacientului si ale tractului digestiv. Intoxicatia cu metale grele este considerată o urgență medicală, iar pacientul ar trebui să fie luat într-o cameră de spital de urgenta.

Tratamentul pentru cele mai multe intoxicatii cu metale grele este tratament chelator. Un agent de chelare specific metalului în cauză este administrat fie oral, intramuscular, sau intravenos. Cei mai frecventi trei agenți de chelare sunt edetat disodic de calciu, dimercaprol (BAL), şi penicilamină. Agentul de chelare înconjoară şi se leagă de metal in tesuturile organismului, formând un complex, acest complex este apoi eliberat din țesut să călătorească în fluxul sanguin.

Complexul este filtrat din sange prin rinichi şi excretat în urină. Acest proces poate fi de lungă durată şi dureros, şi de obicei necesita spitalizare. Tratamentului de chelare este eficace in tratarea intoxicațiilor cu plumb, mercur şi arsen, dar nu este util în tratarea otrăvirii cu cadmiu. Până în prezent, nici un tratament a fost dovedit eficient pentru otravirea cu

cadmiu. Otrăvirea cu taliu este tratat cu o combinatie de albastru de Prusia (hexacianoferat de potasiu feric) şi un diuretic, deoarece aproximativ 35% din aceasta se excretă în urină, cu toate acestea, în cazul în care tratamentul nu este început în termen de 72 de ore de la otrăvire, leziunea sistemului nervos a pacientului poate fi permanentă.

În cazurile ingestiei acute de mercur, arsen sau taliu, pot fi induse vărsături. Cărbunele activat poate fi administrat în cazuri de intoxicații cu taliu. Spălarea stomacului (lavaj gastric) poate fi, de asemenea, utilă. Pacientul poate solicita, de asemenea tratament, cum ar fi lichide intravenoase pentru complicatii ale otravirii, precum şoc, anemie, si insuficienta renala.

Pacienții care au luat arsen, taliu, sau mercur într-o tentativă de sinucidere vor fi văzuti de un psihiatru, ca parte a tratamentului de urgență.

Prognostic

Procesul de chelare poate întrerupe doar efectele ce pot apare în continuare a otrăvirii, el nu poate inversa leziunile neurologice deja suferite.

Prevenirea

Deoarece arsenul şi taliul au fost utilizate în mod obişnuit în otrăvuri pentru şobolani şi insecte la un moment dat, multe țări au încercat să reducă rata de intoxicații accidentale prin interzicerea utilizării de metale grele în produsele de control a dăunătorilor. Taliul a fost interzis în Statele Unite, ca otravă pentru rozătoare în 1984. Ca rezultat, aproape toate cazurile recente de otrăvire cu arsen şi taliului în Statele Unite ale Americii au fost în mod deliberat, mai degrabă decât accidental.

Deoarece expunerea la metale grele este de multe ori un risc profesional, şi ar trebui să fie furnizate şi purtat la locul de muncă îmbrăcăminte de protecție si protectie respiratorie. Îmbrăcămintea de protecție ar trebui să fie apoi lasata la locul de muncă şi sa nu fie purtate acasă, în cazul în care ar putea transporta praf toxic pentru membrii familiei. Industriile sunt îndemnate să reducă sau să o înlocuiască metale grele în procesele lor ori de câte ori este posibil. Expunerea la surse de plumb din mediu, inclusiv vopsele pe bază de plumb, programe sanitare, de evacuare de vehicule, şi a solului contaminat, ar trebui să fie reduse sau eliminate.

Metale grele şi cancerul

Metalele pot deteriora ADN-ul direct şi indirect, şi asta înseamnă un risc crescut de cancer (noi numim acest lucru genotoxicitate). Există, de asemenea, căi non-genotoxice posibile, din cauza iritației sau imuno-toxicitate. Destul de sigur, un număr de metale sunt cunoscute a fi cancerigene.

Acestea sunt: arsenul şi compuşi ai arsenului; beriliu şi compuşi ai beriliului; cadmiu şi compuşi de cadmiului; Compuşi de nichel şi crom hexavalent.

Ținta uzuală sunt plămânii, deşi arsenul are o asociație unica, cu cancerul de piele care a fost recunoscută de mulți ani.

Este un fapt că implanturi metalice în organism (ca, de exemplu, în fixarea osului sau plăcilor) pot fi asociate cu cancerele adiacente, cauzate de iritare a țesuturilor. Regretatul

Patrick Stortebecker la Institutul Karolinska din Stockholm, de asemenea, a subliniat şi frecvența cu care cancerul la maxilar a fost gasit in asociere cu umpluturi amalgam de metal. Asta este deranjant, deoarece acest tip special de "proteze" tinde să fie foarte lung şi foarte frecvent, într-adevăr.

O dezvoltare majoră în stomatologie este implantul de titan, pentru a inlocui dintii pierduti. Dar este un act de credință să presupunem că titanul este inert.

Alte metale toxice

Prezența de metale toxice din sistemul nostru este foarte importanta pentru că ele sunt capabile de a provoca probleme grave de sănătate pentru ca interfera cu functionarea biologica normala. Deşi acestea pot fi găsite în concentrații mari în organism, o serie dintre aceste metale grele (aluminiu, beriliu, cadmiu, plumb şi mercur) nu au nici o funcție biologică cunoscuta. Altele (arsen, cupru, fier si nichel) sunt considerate a fi esențiale in concentratii mici, dar sunt toxice la concentratii ridicate. În general vorbind, metale grele perturba functiile metabolice în două moduri de bază:

În primul rând, ele se acumuleaza si, prin urmare, perturba functia organelor vitale si glandelor, cum ar fi inima, creier, rinichi, oase, ficat, etc.

În al doilea rând, ele inlocuiesc mineralele vitale nutriționale de unde acestea ar trebui să fie în organism, pentru a oferi funcția biologică. De exemplu, enzimele sunt catalizatori practic pentru orice reacție biochimică, în toate procesele vieții pentru sustinerea metabolismului. Dar, în locul calciului din enzimă, poate fi plumb sau cadmiu. Metalele toxice nu pot îndeplini acelaşi rol ca mineralele nutritive, prin urmare, prezența lor devine extrem de perturbatoare pentru activitatea enzimei.

Din cauza impactului lor la un astfel de nivel fundamental, metalele grele pot fi factori de cauzalitate în orice problemă de sănătate. În cazul în care locul de muncă sau a unor circumstanțe de viață vă expuneți la metale grele, v-ar face bine sa reduceti sau sa eliminati expunerea cât mai mult posibil. Fiți conştienți de faptul că există multe modalități ca aceste toxine sa poata fi absorbite în corpul dumneavoastră - prin produse alimentare şi băuturi, expunerea pielii, sau prin aerul pe care il respirati. Deci, ori de câte ori este posibil, purtați mănuşi, utilizeazati aparate de protecție pentru respirație, şi asigurați-vă că obțineti o ventilatie de aer proaspăt.

Surse de metale grele

Prezența de metale toxice din sistemul nostru este foarte importanta pentru că ele sunt capabile de a provoca probleme grave de sănătate pentru ca interfera cu functionarea biologica normala. Deşi acestea pot fi găsite în concentrații mari în organism, o serie dintre aceste metale grele (aluminiu, beriliu, cadmiu, plumb şi mercur) nu au nici o funcție biologică cunoscuta. Altele (arsen, cupru, fier si nichel) sunt considerate a fi esențiale in concentratii mici, dar sunt toxice la concentratii ridicate. În general vorbind, metale grele perturba functiile metabolice în două moduri de bază: În primul rând, ele se acumuleaza si, prin

urmare, perturba functia organelor vitale si glandelor, cum ar fi inima, creier, rinichi, oase, ficat, etc. În al doilea rând, ele inlocuiesc mineralele vitale nutriționale de unde acestea ar trebui să fie în organism, pentru a oferi funcția biologică. De exemplu, enzimele sunt catalizatori practic pentru orice reacție biochimică, în toate procesele vieții pentru sustinerea metabolismului. Dar, în locul calciului din enzimă, poate fi plumb sau cadmiu. Metalele toxice nu pot îndeplini acelaşi rol ca mineralele nutritive, prin urmare, prezența lor devine extrem de perturbatoare pentru activitatea enzimei.

În cazul în care locul de muncă sau a unor circumstanțe de viață vă expuneți la metale grele, v-ar face bine sa reduceti sau sa eliminati expunerea cât mai mult posibil. Fiți conştienți de faptul că există multe modalități ca aceste toxine sa poata fi absorbite în corpul dumneavoastră - prin produse alimentare şi băuturi, expunerea pielii, sau prin aerul pe care il respirati. Deci, ori de câte ori este posibil, purtați mănuşi, utilizeazati aparate de protecție pentru respirație, şi asigurați-vă că obțineti o ventilatie de aer proaspăt.

Aluminiu. (cuvinte cheie ce denotă rolul aluminiului: alaun, folie de aluminiu, hrana pentru animale, antiacide, aspirina, auto, praf de copt, bere, făină albita, cutii de conserve, ceramica, brânză, filtre de țigară, aditivi de culoare, materiale de constructii, vase, cosmetice, amalgamele dentare, deodorante, apă potabilă, agenți de uscare, praf, cabluri izolate, compuşi medicamentosi, produse lactate, spray nazal, pesticide, poluare, sare, apa de la robinet, fumul de tutun, pasta de dinti, apa tratată, praf de vanilie. Cu alte cuvinte este un metal omniprezent..
*Efecte***:** ALS, boala Alzheimer, anemia, pierderea poftei de mâncare, probleme de comportament, carii, raceli, colita, confuzie, constipație, demență, gură uscată, piele uscată, pierderea de energie, transpiratie excesiva, flatulență, dureri de cap, arsuri la stomac, hiperactivitate, inhibarea sistemelor enzimatice, disfunctii renale, reducerea functiei imunitara, dizabilitati de invatare, spasme musculare la picioare, disfuncție hepatică, pierderi de memorie, tulburări neuromusculare, amorțeală, osteoporoza, paralizie, boala Parkinson, ulcer peptic, psihoză, reducerea activitatii intestinale, senilitate, probleme ale pielii, dureri de splină, dureri de stomac şi dureri musculare slabe.

Arsen: **materialele de constructii tratate la foc cu arsen, arderea cărbunelui, spray-uri de insecte, pesticide, soluri (bogate in arsen), fructe de mare din apele de coastă, în special scoici, stridii şi creveți.**
Efecte**:** Dureri abdominale, anorexie, unghii casante, diaree, greață, vărsături, anemie cronica, senzație de arsură în gură / esofag / stomac / intestin, confuzie, convulsii, dermatită, somnolență, inhibarea enzimelor, miros de usturoi a respiratiei / scaun, căderea părului, dureri de cap , hiper-pigmentare a pielii şi a unghiilor, risc crescut de cancer de ficat / pulmonar / de piele, febră scăzuta, mucoase în nas şi gât, dureri musculare / spasme / nervozitate, slăbiciune, infecții ale tractului respirator, dificultate de înghițire, gust dulce metalic, strângere de gât.

Beriliu arderea cărbunelui, in fabricație, produse de uz casnic, praf industrial.

Efecte: tulburări ale metabolismului calciului şi vitaminei D, epuizarea magneziului, cancer pulmonar, infecții pulmonare, rahitism, disfuncție de organe vitale.

Cadmiu: contaminanți industriali din aer, baterii, bomboane, ceramica, fumul de tigara, cola, intoxicație congenitala, rafinării de cupru, aliaje de cupru, aliaje dentare, apă potabilă, galvanizare, îngrăşăminte, produse alimentare din sol contaminat, fungicide, incinerarea de anvelope / cauciuc / plastic, cafea instant, acoperisuri de fier, rinichi, ficat, marijuana, carne procesata, lapte evaporat, ulei de motor, stridii, vopsea, pesticide, tevi zincate, alimentele procesate, cereale rafinate / cereale din făină, cauciuc, covor suport din cauciuc, produse de mare (cod, eglefin, stridii, ton), canalizare, argint rafinat (lustruit), topitorii, apa moale, suduri (inclusiv în cutii de alimente), tutun, masina ambulanta de bauturi racoritoare, unelte, lămpi cu vapori, apă (oraş, dedurizată, bine), metal de sudură.
Efecte: alcoolism, alopecie, anemie, artrita (osteo şi reumatoidă), boală osoasă, dureri osoase în mijlocul de oase, cancer, boli cardiovasculare, carii, hemoragie cerebrală, ciroza, diabet zaharat, tulburări digestive, emfizem, inima marita, simptome asemănătoare gripei, insuficiență de creştere, dureri de cap, colesterol ridicat, comportament hiperkinetic, hipertensiune, hipoglicemie, impotenta, inflamare, infertilitate, boli de rinichi, tulburări de învățare, leziuni hepatice, boli pulmonare, migrene, leziuni ale nervilor din celule, osteoporoza, disfuncții de prostata, tulburări de reproducere, schizofrenie.
Cadmiul şi compuşii săi (oxid, clorură, sulfit sau sulfură de cadmiu) determină apariția de sarcoame locale la şobolani. Expunerile profesionale la cadmiu (mai ales oxidul de cadmiu) cresc riscul apariției cancerului de prostată la om.

Cupru: pastile pentru controlul naşterilor, intoxicații congenitale, vase de cupru, DIU cu cupru, țevi de cupru, aliaje dentare, fungicide, maşini de gheață, emisiile industriale, insecticide, piscine, apă, sudări, avocado, bere, făină de oase, ciocolata, ulei de porumb, crabi, gelatină, cereale, carne de miel, ficat, homar, margarina, lapte, ciuperci, nuci, carne de organe, stridii, biban, seminte, crustacee, soia, germeni de grâu, drojdie de bere

Efecte: acnee, insuficiență suprarenală, alergii, alopecie, anemie, anorexie, anxietate, artrită (osteo & reumatoidă), autism, cancer, frisoane, fibroza chistica, depresie, diabet, tulburari digestive, gură uscată, disinsulinism, dominarea estrogenului, oboseală, temeri, fracturi, ciupercă, atac de cord, hipertensiune arterială, nivel ridicat de colesterol, boala Hodgkin, hiperactivitate, hipertensiune, hipertiroidism, acid scăzut clorhidric, hipoglicemie, infecții, inflamații, insomnie, pierderea de fier, icter, tulburări renale, scăderea libidoului, limfom, boală mintală, migrene, modificări ale dispoziției, scleroză multiplă, infarct miocardic, greață, nervozitate, osteoporoza, disfunctii pancreatice, atacuri de panică, paranoia, fobii, PMS, schizofrenie, senilitate, disfuncții sexuale, senzație de Spacey, balbaiala, carii, accident vascular cerebral, caderea dintilor , toxemia de sarcină, infecții ale tractului urinar, infecții cu fungi.

Fier:apă potabilă, vase de fier, țevi de fier, sudura,. alimente: melasa, făina de oase, tărâțe, arpagic, scoici, inima, rinichi, legume cu frunze, legume, ficat, carne, melasă, nuci, carne de organe, stridii, patrunjel, vin roşu, alimentele rafinate, crustacee, soia, germeni de grau , cereale integrale.

Efecte: amenoree, furie, artrită reumatoidă, malformații congenitale, sângerarea gingiilor, cancer, constipație, diabet, amețeli, probleme emoționale, oboseală, dureri de cap, dureri de inimă, insuficiență cardiacă, hepatită, hipertensiune arterială, ostilitate, hiperactivitate, infecții, insomnie, iritabilitate, dureri articulare, boli hepatice, pierderea de greutate, probleme mentale, gust metalic în gură, miastenia gravis, greață, dureri ale pancreasului, boala Parkinson, îmbătrânirea prematură, schizofrenie, scorbut, dificultăți de respirație, încăpățânare.

Plumb: frasin, gaze de esapament, baterie de fabricație, făină de oase, conserve din fructe şi suc, baterii auto, fumul de tigară, arderea cărbunelui, cerneluri colorate, intoxicații congenitale, cosmetice, tacâmuri, galvanizare, praf de uz casnic, din producția sticlei, vopsele de păr, emisiile industriale, țevi de plumb, geamuri de faianță ceramică lustruite cu plumb, ficat, rimel, metal lustruit, lapte, ziare, carne de organe, vopsea, creioane, pesticide, produse aproape de drumuri, chituri, apa de ploaie, pvc containere, rafinării, topitorii, ninsoare, cutii de conserve cu plumb de etanşare sau lipit (cum ar fi sucuri, legume), tutun, pastă de dinți, jucării, apă, vin.

Efecte: dureri abdominale, insuficiență suprarenală, alergii, anemie, anorexie, anxietate, artrită (reumatoidă şi osteo), deficitul de atenție, autism, dureri de spate, tulburări de comportament, orbire, boli cardiovasculare, distrugerea cartilajului, pierderea coordonării, pierderea de concentrare, constipație , convulsii, surditate, depresie, dislexie, instabilitate emoțională, encefalită, epilepsie, oboseala, gută, halucinații, dureri de cap, ostilitate, hiperactivitate, hipertensiune arterială, hipotiroidie, impotență, supresia sistemului imunitar, scădere de IQ, indigestie, infertilitate, insomnie, iritabilitate, dureri articulare, tulburări renale, dificultăți de învățare, disfuncție hepatică, pierderi de memorie (pe termen lung), probleme menstruale, modificări ale dispoziției, dureri musculare, slăbiciune musculară, distrofie musculară, scleroză multiplă, mielopatie (patologia măduvii spinării), nefrită, greață, coşmaruri, senzație de amorțeală, boala Parkinson, neuropatii periferice, psihoză, disfuncție psihomotorie, disfuncție renală, nelinişte, retard, schizofrenie, convulsii, sterilitate, născuți morți, pentru sugari sindrom de moarte bruscă, furnicături, carii dentare, vertij, scădere în greutate neintenționată.

Mercur: adezivi, filtre de aer conditionat, antiseptice, fabricarea bateriilor, pudre de corp, termometre sparte, arderea de ziare şi materiale de construcție, loțiuni calomel, cereale, intoxicații congenitale, cosmetice, amalgamele dentare, diuretice, emolienți pentru țesături, fetru, ceară de podea, fungicide, germicides, cereale, deşeuri industriale, insecticide, laxative, cherestea, fabricarea hârtiei şi a clorului, medicamente, mercurochrome, vopsele, produse din

hârtie, pesticide, fotogravura, apă poluată, unguent pentru psoriazis, produse de mare (în special tonul şi peştele-spadă), eliminare prin canalizare, creme pentru iluminat pielea, soluție pentru lentile de contact moi, supozitoare, tăbăcirea pielii, tatuajul, apa (contaminată), conservarea lemnului.

Efecte: disfuncția suprarenalelor, alergie, alopecie, anorexie, anxietate, malformații congenitale, inroşire, leziuni cerebrale, cataractă, paralizie cerebrală, coordonare săracă / mişcări sacadate, surditate, depresie, dermatită, descurajare, amețeli, somnolență, eczeme, tulburări emoționale, exces de salivă, oboseală, sângerare şi durere, dureri de cap (tip bandă), pierderea auzului, hiperactivitate, hipotiroidism, uitare, disfuncții ale sistemului imunitar, insomnie, iritabilitate, dureri articulare, leziuni renale, pierderea auto-controlului, pierderi de memorie, retard mintal, gust metalic, migrene, nervozitate, degenerarea fibrelor nervoase, amorțeală, dureri la nivelul membrelor, erupții cutanate, schizofrenie, retinită, timiditate, tulburări de vorbire, tendințe sinucigaşe, furnicături, tremurături (pleoape, buze, limbă, degete, extremități), pierderea vederii, slăbiciune.

Nichel: unt, îngrăşăminte, prelucrarea produselor alimentare, arderea uleiului de combustibil, grăsimi şi uleiuri hidrogenate, imitații de frişcă, deşeuri industriale, varec, margarină, testarea dispozitivelor nucleare, stridii, vase din oțel inoxidabil, ceai, fumul de tutun, semințe şi cereale nerafinate, scurtarea legumelor.

Efecte: anorexie, disfuncție renală, apatie, perturbarea metabolismului hormonilor şi cel lipidic febră, hemoragii, dureri de cap, atac de cord, cancer intestinal, scăderea tensiunii arteriale, tremurături musculare, greață, cancer oral, probleme ale pielii, vărsături.

Nichelul şi compuşii săi (oxid, carbonat) induc sarcoame la şoarece, şobolan şi hamster.

Protecția prin alte metale: Prezența unui metal secund poate de fapt să protejeze de toxicitate. Astfel, de exemplu, magneziu în studii pe animale poate preveni toxicitatea cadmiului, care induce tumori testiculare. Zincul blochează cancerul pulmonar cauzat de inhalarea continuă de cadmiu. Atât magneziu cât şi manganul au fost eficiente în prevenirea tumorilor formate la locul de injectare cu nichel la şobolani.

De fapt, magneziu are o mare varietate de efecte benefice împotriva factorilor de risc de carcinogeneză de metale. Avem un alt motiv că magneziul este unul dintre cele mai importante elemente nutritive şi de sănătate.

Se menționează că seleniul este un protecor vital împotriva mercurului şi are, de asemenea, un puternic efect anti-cancer. În cazul în care consumul zilnic este de 100 de micrograme sau mai mult, riscul de cancer scade dramatic din toate cauzele.

Chelatarea

Chelatorii de tipul DMPS, DMSA, KELMER şi EDTA pot lega metalele grele toxice. În cazul în care situația este gravă, de exemplu, supraîncărcarea cu plumb sau cupru, se administrează i.v. acid etildietilamino-tetraacetic (EDTA), într-o serie de infuzii la 3 ore interval.

Din păcate, acest tratament este inadecvat pentru toxicitatea dată de mercur. Există trei strategii eficiente pentru mercur, fiecare cu argumente pro şi contra: 6 - 10 perfuzii i.v. din

DMPS, 3 mgms pe kg de greutate corporală. Acestea necesită experiență calificată, dar făcută în mod corespunzător şi la doza corectă, nu au practic nici un efect secundar. Riscul teoretic este faptul că DMPS traversează bariera hemato-encefalică şi poate duce mercur în țesuturi neurologice, în cazul cel mai nedorit. Efectele secundare pot fi neplăcute şi acest lucru pare a fi metoda cea mai puțin recomandabilă.

DMSA orală, 30 mg per kg greutate corporală. Durata depinde de răspuns, dar în aproximativ de 6 - 10 săptămâni. Efectele secundare pot fi neplăcute, dar pot fi ameliorate prin reducerea dozei. În general, copiii tolerează mult mai bine decat adultii DMSA.

Există controverse că dacă EDTA elimină mercurul. Pentru tot felul de motive ştiințifice, care au de a face cu valența şi încărcătura electrică, acesta nu ar trebui să funcționeze bine. Dar Dr. Gary Gordon cere: prin urină recentă şi testarea țesuturilor, în care se poate observa că fost excretată după regimul de chelare orală (care include, desigur, mult mai mult decât simpla EDTA). Terapia auto-administrată nu este recomandată. Dar Chlorella este un atractor mare de metale grele, este sigură şi din belşug, mai puțin usturoiul şi coriandru.

O dată ce sursa de contaminare este eliminată, dacă corpul are o bună capacitate de de-toxifiere, metale grele vor dispărea treptat şi lent din țesuturi, printr-un proces numit leşiere sau, mai exact, de epurare.

Otrăvirea accidentală

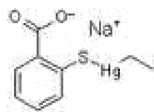
De pildă, otrăvirea accidentală cu mercur poate fi provocată prin**:**
- Consumul de apă contaminată
- Consumul de peşte contaminat cu mercur
- Extragere de mercur din plombe dentare montate prost.
- De la vaccinurile ce conțin timerosal.

Toxicitatea de metale grele din apă potabilă contaminată: A fost estimat că americanii de rând sunt expuşi la apă de robinetul cu conținut de metale grele la niveluri care depăşesc limita de siguranță superioară.

Crima prin otrăvire cu metale grele

S-au raportat numeroase cazuri de sinucidere prin înghițire de mercur de la termometre. Dureri atroce durau şi o săptămână, iar prognosticul era nefavorabil. De asemenea, au fost semnalate crime comise cu ajutorul clorurii mercurice.

Toxicitatea mercurului de la vaccinări care conțin thimerosal:



Thimerosal structura

Aceasta este una dintre problemele cele mai de actualitate de pe toxicitatea mercur. Este unul care câştigă teren în mod constant a opiniei publice încă de legătură între autism şi vaccinările a fost propusa pentru prima data. Un fapt puțin cunoscut înainte de campanii de sensibilizare a

opiniei publice a început este faptul că conservant, de obicei, adaugă la thimerosal vaccinuri contin mercur. În 1999, la Centrul pentru Controlul si Prevenirea Bolilor (CDC) a solicitat pentru eliminarea mercurului din vaccinuri. Paradoxal, CDC continuă să se recomande pojarului, oreionului şi rubeolei.
Copiii mici sunt deosebit de sensibile la mercur toxicitate şi statisticile au arătat că de la introducerea de thimerosal în vaccinuri în 1990 a existat o creştere de 10 ori a incidentei autismului. Mulți părinți raport, de asemenea, debutul de comportament autist la copiii lor, în termen de zile de la vaccinare. Surprinzator, 40% dintre părinții copiilor cu autism se spune să credem că vaccinurile cauza bolii.

Efectele de mercur asupra sistemului nervos central este bine documentat. Expunerii excesive prenatale duce la funcțiile întârziate de dezvoltare, inclusiv mersul pe jos intarziata, dezvoltarea vorbirii amânată şi afectarea auzului
Thimerosal conservant este cel mai frecvent utilizat în vaccinuri şi biologice care sunt comercializate in Statele Unite. Thimerosal este utilizat pentru a ajuta la prevenirea unui vaccin de la rasfat, pentru inactivarea bacteriilor folosite pentru a formula mai multe vaccinuri, şi pentru a preveni contaminarea bacteriana a produsului final. Mai multe dintre vaccinuri recomandate de rutină pentru copii în Statele Unite conțin thimerosal. Cu toate acestea, rapoartele au aparut leaga thimerosal la intoxicatii cu mercur la sugari, cauzând adesea autism.
Simptomele de otrăvire cu mercur: dureri abdominale, gastroenterită, greață, salivație excesivă, slaba coordonare, pierderea poftei de mâncare şi pierderea în greutate, anurie (producția de urină se opreşte), şi nefrita (boala de rinichi). Pe termen lung, expunerea la substante toxice poate duce, de asemenea, la infertilitate la barbati si femei. Toxicitatea afectează, de asemenea, rezultatul sarcinii şi, de asemenea, a fost legată cu boli cardiovasculare. Într-un studiu de peste 2000 de oameni, ridicat de mercur conținut de păr a fost legat cu un risc crescut pentru boli de inima si accident vascular cerebral.
În tineri, mercur toxicitate, de obicei, duce la dificultăți de învățare din copilărie (a se vedea mai sus discuția asupra autismului).

Cercetări privind efectul otrăvitor al metalelor

Plumbul

Plumbul este un element care se găseşte în mod natural în scoarța terestră, utilizat de oameni încă de la începuturile civilizației. Ca urmare a activităților umane, plumbul a fost larg răspândit în mediu, regăsindu-se în aer, apă, sol, plante, animale, alimente şi diverse construcții.

Otrăvirile cu plumb de proporții epidemice au fost raportate pe toată durata mileniului trecut, un exemplu constituind oraşul Devon în 1738 prin cidrul contaminat cu Pb.

În natură plumbul se găseşte mai ales sub formă de sulfuri, dar şi sub formă de carbonați, sulfați şi cromați. În zonele rurale necontaminate concentrația plumbului în sol este mai mică de 50 mg/kg. Ca urmare a poluării antropogene concentrația acestuia în sol poate

atinge 1000 mg/kg sol. Sursele de contaminare ale solului sunt utilizarea deşeurilor ca fertilizanţi, emisiile industriale şi auto.

Transferul sol-plantă este relativ scăzut, iar transferul de la rădăcini în alte organe ale plantei este limitat. Concentraţia mare de plumb în plante este în majoritatea cazurilor rezultatul contaminării solului sau prin depunerea de praf pe legumele cu frunze.

Nivelul plumbului în apa de băut şi în apele de adâncime în majoritatea ţărilor europene este sub 20µ/L. Concentraţii mai mari pot fi observate în zone cu apă moale şi în cazul utilzării ţevilor din plumb. Apa potabilă care conţine carbonaţi acizi de calciu şi magneziu şi sulfaţi solubilizează plumbul când este fierbinte sau când a stat în ţevi mai mult timp. Fierberea apei nu va îndepărta plumbul, dar îndepărtarea apei care staţionează pe ţevi prin lăsarea apei să curgă câteva minute înainte de utilizare şi utilizarea apei reci pentru băut reduce expunerea.

Concentraţia plumbului în apa mărilor este mai mică decât în apele dulci fiind între 0,003-0,4µg/L. Plumbul se găseşte sub diferite forme în apa marină şi apa dulce, iar majoritatea plumbului găsit în peşti este legat de proteine.

Limita admisă în prezent este de 50 µg/L apă şi va fi progresiv redusă la 10 µg/L.

Alimentele pot fi contaminate cu plumb şi în timpul producţiei, procesării şi ambalării.

În timpul producţiei, în afară de aportul de plumb din mediul poluat (sol, apă, aer), mai ales în zonele industrializate şi cu circulaţie intensă a autovehiculelor, acest metal mai poate ajunge în produsele vegetale prin aplicarea de pesticide pe bază de plumb, cum este arseniatul de plumb.

Alte surse de contaminare a alimentelor includ: glazura vaselor ceramice care conţine un amestec de bioxid de siliciu şi oxizi de plumb, vinul şi alcoolul făcut în casă, distilat sau păstrat în vase de plumb, introducerea frauduloasă de miniu de plumb (Pb_3O_4) în boia, de cromat de plumb ($PbCrO_4$) pentru colorarea în galben a untului sau margarinei şi de carbonat de plumb ($PbCO_3$) pentru albirea făinei.

Toxicitatea plumbului .Toxicitatea plumbului depinde de numeroşi factori, cum ar fi vârsta, nutriţia, starea fiziologică, doza, mărimea particulelor, forma sub care se găseşte (organică sau anorganică), calea de pătrundere.

Majoritatea animalelor de fermă tolerează aproximativ 30 mg Pb/kg hrană, cu excepţia oilor, care se pare că tolerează doar 10 mg Pb /kg hrană.

Toxicocinetica

Plumbul anorganic poate pătrunde în organism pe cale orală, respiratorie sau dermică. Studiile pe animale au arătat că plumbul este bine absorbit pe cale transdermică.

Expunerea pe cale respiratorie

Plumbul din aerul atmosferic se găseşte sub formă de aerosoli şi particule materiale şi poate fi depozitat în tractul respirator atunci când aerosolii sunt inspiraţi. Proporţia şi modul de depozitare a aerosolilor în tractul respirator sunt determinate de mărimea particulelor, factori dependenţi de vârstă, care determină modul de respiraţie (pe gură sau pe nas), geometria căilor respiratorii şi viteza curentului de aer în tractul respirator. Particulele mari care sunt depozitate în

regiunile ciliate (regiunile nasofaringiene şi traheobronşice) pot fi transferate mucociliar în esofag şi, apoi, înghițite. Particulele mici care pot fi depozitate în regiunile alveolare pot fi absorbite după disoluția extracelulară sau ingerarea de către celulele fagocitare.

Expunerea pe cale orală

Rata şi proporția absorbției gastrointestinale a plumbului ingerat sunt influențate de starea fiziologică a individului expus şi caracterele fizico-chimice ale plumbului ingerat. Absorbția poate fi influențată şi de cantitatea de plumb ingerată.

Efectul vârstei. Absorbția gastrointestinală a plumbului hidrosolubil pare să fie mai mare la copii decât la adulți. Studiile la copii (între 2 săptămâni şi 8 ani) au indicat că aproximativ 40-50 % din plumbul ingerat este absorbit. La adulți se estimează că absorbția compuşilor hidrosolubili de plumb variază între 3 şi 10%.

Efectul flămânzirii. Prezența alimentelor în tractul gastrointestinal scade absorbția plumbului hidrosolubil. La adulți, absorbția acetatului de plumb a fost de aproximativ 63% când a fost ingerată de indivizi flămânzi şi 3% când a fost ingerată cu mâncare.

*Efectul nutriției***.** Absorbția plumbului la copii este influențată de statusul nutrițional al fierului. Copiii care sunt deficitari în fier au concentrații mai mari de plumb în sânge, comparativ cu copiii care nu sunt deficitari, ceea ce sugerează că deficiența în fier poate determina absorbție crescută de plumb. Acest lucru a fost demonstrat din studiul pe animale. La şobolani, deficiența în fier creşte absorbția gastrointestinală a plumbului, posibil prin creşterea legării plumbului la proteinele care leagă fierul în intestin.

Aportul calciului prin rație pare să influențeze şi el absorbția plumbului. A fost observată o corelație inversă între aportul de calciu şi concentrația plumbului în sânge la copii, dar şi la adulți. În studiile experimentale pe şobolani s-a demonstrat depleția crescută a calciului din rație în carență de vitamina D.

Distribuția

Perioada de înjumătățire a plumbului în sânge este de aproximativ 30 de zile. Plumbul se găseşte aproape în exclusivitate în hematii (99%). Cea mai mare parte a plumbului din hematii este legată de proteinele din celulă şi mai puțin de membrana eritrocitară. Aproximativ 40-75% din plumbul din plasmă este legat de proteinele plasmatice, dintre care albuminele par să fie principalii liganzi. Plumbul se mai poate lega şi de globuline. Plumbul din ser care nu este legat de proteine se găseşte mai ales sub formă de complecşi cu compuşi sulfhidril cu greutate moleculară mică şi cu alți liganzi.

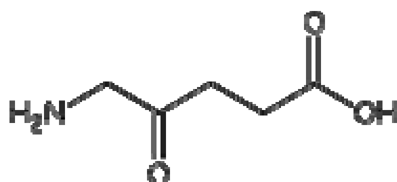
La adulți, aproximativ 94% din plumb se găseşte în oase. La copii acest procent este de doar 73%. Concentrația plumbului din oase creşte cu vârsta, ceea ce indică un turnover relativ lent al plumbului în osul adult. Acest depozit mare de plumb în osul adult poate surveni pentru menținerea nivelului sangvin de plumb mult timp după ce expunerea a încetat.

Plumbul nu este distribuit uniform în oase, ci se acumulează în acele regiuni ale osului, în care procesul de calcifiere este mai activ la momentul expunerii. La copii, plumbul este depozitat pe osul la trabecular, iar la adulți, atât în osul trabecular, cât şi cel cortical. Deşi la maturitate majoritatea plumbului din organism este depozitat în oase şi dinți, plumbul din

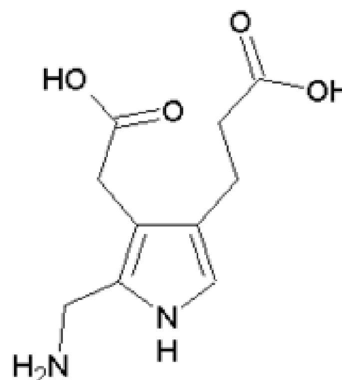
regiunile corticale ale oaselor este parțial labil şi este eliberat în fluxul sanguin şi țesuturile moi prin difuzie şi resorbție. Gestația, alăptarea, osteoporoză postmenopauzală determină creşterea nivelelor sanguine ale plumbului, ca rezultat al mobilizării acestuia din depozitele osoase.

Metabolizarea

Metabolismul plumbului anorganic constă în formarea unor complecşi cu o mare varietate de liganzi proteici şi neproteici. Fiind un cation divalent, capacitatea mare de legare a acestuia la proteinele sulfhidril creează interferențe cu enzime şi proteine structurale. Cea mai cunoscută este interferența cu calea de sinteză a hemului şi scăderea subsecventă a rezervelor de hem din organism sunt unele din principalele cauze ale patologiei determinate de plumb. Când nivelul plumbemiei depăşeşte 20 de μg/dl, activitatea ALAD este inhibată în proporție de 50 %. Totuşi activitatea ALAD poate fi blocată şi în porfirie, ciroză hepatică şi alcoolism. În plus nivelele ALAD nu pot fi utilizate pentru diagnosticarea gradului de toxicitate al plumbului, deoarece corelația dintre plumbemie şi ALAD nu este liniară. Inhibiția ALAD previne concentrarea acidului aminolevulinic în profobilinogen, inhibând încorporarea fierului în inelul protoporfirinic.



acid aminolevulinic



Protofibilinogen

a acestor modificări în activitatea enzimelor se constată anemie şi oboseală. În plus, creşte nivelul circulator al ALA, ceea ce duce la scăderea eliberării GABA în sistemul nervos central, ceea ce poate explica tulburările comportamentale observate în intoxicația cu plumb.

Plumbul inhibă şi 5- pirimidin- nucleotidaza din eritrocite ceea ce determină acumularea de pirimidin–nucleotide în eritrocite sau reticulocite şi distrucția subsecventă a acestor celule.

Plumbul anorganic sau plumbul alchil este activ metabolizat în ficat prin dealchilare oxidativă catalizată de citocromul P_{450}, rezultând trietil- şi trimetil-plumb, metaboliți puternic neurotoxici.

Eliminarea

Indiferent de calea de pătrundere, plumbul absorbit este eliminat în primul rând prin urină şi fecale. Mecanismul eliminării prin fecale a plumbului absorbit nu este bine înțeles; totuşi, căile de eliminare pot include secreția în bilă, sucul gastric şi salivă, reprezentând aproximativ o treime din excreția totală a plumbului absorbit. Alte căi de eliminare sunt

reprezentate de transpirație, lapte, păr şi unghii. În cazul animalelor, eliminarea prin lapte şi ouă este mică şi devine semnificativă numai la aport mare.

Efecte patogene

Plumbul este un toxic cumulativ, care produce numeroase efecte toxice, dar în special în sistemul hematopoetic, sistemul nervos şi în rinichi.

Simptomele inițiale, timpurii ale intoxicației acute cu plumb, întâlnite la muncitorii expuşi profesional sau la indivizi expuşi la nivele ridicate de plumb, sunt cele gastrointestinale şi anume colica de plumb. Aceasta este caracterizată de combinația următoarelor simptome: dureri abdominale, constipație, crampe, vomă, greață, anorexie şi scăderi în greutate.

Efectele hematologice

Expunerea la plumb determină anemie microcitară şi hipocromă şi uşoară anemie hemolitică. Aceasta este determinată atât de inhibarea sintezei hemului, cât şi de scurtarea duratei de viață a eritrocitelor. Plumbul interferă cu sinteza hemului prin alterarea activității dehidrazei acidului delta-aminolevulinic (ALAD) şi a ferochelatazei. Ca o consecință a acestor modificări, biosinteza hemului este scăzută şi activitatea enzimei corespunzătoare, delta-aminolevulin sintetaza (ALAS), care este inhibată prin feedback de către hem, este ulterior crescută.

Rezultatele finale ale acestor modificări în activitatea enzimelor sunt creşterea porfirinelor urinare, coproporfirinelor şi a acidului delta-aminolevulinic, creşterea nivelului sanguin şi plasmatic al ALA şi creşterea protoporfirinelor eritrocitare.

Modificările hematologice asociate plumbului sunt considerate reversibile.

Efectul plumbului asupra sistemului nervos. Având în vedere posibila expunere încă din stadiul prenatal prin placentă şi apoi prin lapte sau apa utilizată pentru refacerea laptelui praf, simptomele neurotoxice pot fi observate încă de la vârste mici. Deoarece plumbul afectează procesele de dezvoltare nervoasă întreruperea acestor procese poate conduce la alterări permanente ale funcției cerbrale.

Una dintre cauzele majore ale efectelor neurotoxice ale plumbului este faptul că este în competiție cu calciul sau mimează acțiunea acestuia. La concentrații picomolare, plumbul este în competiție cu calciul pentru situsurile de legare din cerebel ale fosfochinazei C. Acest proces afectează intrarea în celule a calciului şi funcționarea neuronilor, alterând structura mitocondrială, ceea ce duce la inhibarea respirației celulare, alterarea reacțiilor bazate pe calciu şi transmiterea influxului nervos. Aceasta conduce la creşterea eliberării spontane a neurotransmițătorilor şi inhibarea eliberării controlate stimulate a acestora. Acest tip de toxicitate afectează în principal sistemul nervos în dezvoltare a fetusului, căruia îi lipsesc proteinele care leagă plumbul din astrogliile mature, care, în mod normal, chelatează şi elimină plumbul. Plumbul este toxic pentru astrocitele imature şi interferează cu formarea mielinei, ambele procese fiind implicate în formarea barierei hematoencefalice. Când această barieră este lezată, în SNC pătrund proteine moleculare ca albuminele, determinând edem, presiune intracranială crescută şi encefalopatie.

Simptomele timpurii ale neurotoxicității plumbului, atât la copii, cât şi la adulți, includ iritabilitatea, durerea de cap, perioadă de atenție scăzută, pierderea memoriei şi atenuarea stării cognitive. Pe măsură ce expunerea continuă, se constată simptome de impulsivitate, inabilitate de a urma anumite direcții, dorință de joacă scăzută, IQ scăzut şi atenție scăzută, dizabilități de citire şi putere de concentrare la examene scăzută. Astfel de simptome au fost constatate la nivele sangvine ale plumbului între 10 – 35 μg/dl.

Cel mai grav efect la adulți este encefalopatia, care prezintă ca simptome inițiale slăbiciunea, iritabilitatea, perioadă de atenție redusă, durerile de cap, tremurul muscular, pierderea memoriei şi halucinații. Aceste stări se pot înrăutăți, ajungându-se la delir, convulsii, paralizie, comă şi moarte. Astfel de simptome pot fi întâlnite la concentrații ale plumbului cuprinse între 50 – 300 μg/dl.

Efecte musculo-scheletice. La persoanele expuse la cantități mari de plumb, fie profesional, fie ca urmare a consumului de whisky contaminat cu plumb se constată slăbiciune musculară, crampe şi dureri articulare.

Într-un studiu realizat de Campbell şi colab. în 2004 în ceea ce priveşte expunerea la plumb şi densitatea osoasă, la copii s-a constatat, contrar aşteptărilor, că indivizii cu expunere cumulativă mare au prezentat densitate osoasă mai mare decât în expunere mai mică. Autorii studiului au emis ipoteza că plumbul accelerează maturarea osoasă prin inhibarea proteinelor care reduc rata de maturare a condrocitelor în formarea endocondrală osoasă. Un vârf scăzut al densității minerale osoase atins în faza de adult tânăr poate predispune la osteoporoză mai târziu.

Studiile realizate pe animale în ceea ce priveşte expunerea orală la plumb şi creşterea oaselor şi metabolizarea la animale indică faptul că aportul oral de plumb tulbură creşterea osoasă şi remodelarea, fapt indicat de densitatea osoasă scăzută şi conținutul în calciu al osului, scăderea volumului trabecular osos, activitatea de resorbție crescută şi morfologie alterată a creşterii lamelare. S-a mai constatat că plumbul întârzie mineralizarea dinților, rezultând un smalț mai puțin dur şi rată de erupție scăzută a dinților.

Efecte renale. Nefrotoxicitatea plumbului este caracterizată prin nefropatii tubulare proximale, glomerulare, scleroze şi fibroze interstițiale. La oamenii expuşi la exces de plumb s-a constatat proteinurie, transport deficitar al anionilor organici şi ai glucozei şi rată de filtrare glomerulară scăzută.

Expertiza produselor de origine animală

Carnea rezultată din sacrificările de necesitate va fi dată în consum dezosată şi dacă este corespunzătoare organoleptic şi bacteriologic, iar conținutul de plumb este de sub 1 mg/kg. Capul şi organele se confiscă şi se prelucrează tehnic. Laptele se supune examenului toxicologic şi, dacă se constată depăşirea limitelor maxim admise, se retrage din consum.

Aportul plumbului prin rație şi nivele maxime admise

Estimări recente ale aportului de plumb bazate pe date din diferite țări europene indică valori cuprinse între 0,001-0,008 mg/kg greutate corporală/săptămână pentru adulți şi până la 0,019 mg/kg pentru copii. Contribuția fiecărui tip de aliment la aportul de plumb a fost calculată

de autoritățile australiene. Deşi aceasta pare să nu corespundă cu rația europeană, calculul arată că laptele contribuie cu 16% în rația copiilor, iar carnea cu aproximativ 5-7% din contaminarea rației adulților.

Limitele admise sunt reglementate de organismele abilitate din fiecare țară. Astfel, pentru aer, EPA (Environmental Protection Agency,SUA) recomandă maxim 1,5 $\mu g/m^3$ pentru plumb şi compuşii săi, iar pentru apă 0,015 mg Pb/l.

FDA recomandă ca aditivii alimentari să nu conțină concentrații mai mari de 10 ppm Pb, iar apa de băut îmbuteliată 0,005 mg/l. Limita permisă de expunere profesională este de 0,05 mg/m^3.

Legislația națională, în acord cu cea europeană stabileşte ca nivele admise de plumb în diverse produse următoarele valori (Tabelul 1)

Tabel 1. Nivelurile maxime admise pentru plumb în alimente

Produsul	**Limita maximă admisă (mg/kg)**
Lapte crud, lapte pentru procesare în produse pe bază de lapte şi lapte tratat termic	0,02
Lapte praf	0,02
Carne de bovine, ovine, porcine şi carne de pasăre	0,1
Organe comestibile de bovine, ovine, porcine şi Pasăre	0,5
Carne de peşte	0,3
Crustacee	0,5
Moluşte bivalve	1,5
Cefalopode	1
Grăsimi şi uleiuri de origine animală	0,1
Cereale	0,2
Legume	0,1
Varză, legume frunzoase şi toate ciupercile Cultivate	0,3
Fructe, exclusiv cele cu boabe şi fructe mici	0,1
Fructe cu boabe şi fructe mici	0,2
Sucuri de fructe, concentrate de fructe şi nectar de fructe	0,05
Vinuri, cidru şi vinuri de fructe	0,2

Arsenul

Arsenul este dificil de caracterizat în particular ca un singur element deoarece chimia lui este atât de complexă şi sunt mulți compuşi diferiți ai arsenului. Arsenul poate fi trivalent sau pentavalent şi este larg răspândit în natură. Cei mai comuni compuşi trivalenți ai arsenului sunt trioxidul de arsen, arsenitul de sodiu şi tricloritul de arsen. Compuşii anorganici pentavalenti sunt pentaoxidul de arsen, acid arsenic şi arsenații precum arsenatul de plumb sau arsenatul de calciu.

Arsenul este îndeosebi transportat în mediu prin apă şi prin aer prin intermediul contaminării industriale şi poate varia între câteva nanograme şi câteva zeci dintr-un microgram pe metru cub. Acesta se leagă covalent cu majoritatea nemetalelor (în special cu oxigenul şi sulful), dar şi cu metalele (de exemplu cu calciul şi plumbul).

Intoxicațiile cu arsen pot avea următoarele posibile surse:

1.Surse naturale: soluri care conțin minereuri cu arsen şi ape de adâncime (în special cele din apropierea zonelor cu activitate geotermală). Arsenul este prezent în toate tipurile de soluri, nivelul mediu fiind de 5-6 mg/kg, acesta putând însă varia considerabil. Concentrații variabile ale arsenului pot fi întâlnite în râuri, lacuri şi apa de băut. Valori foarte ridicate au fost găsite în apele de adâncime cu activitate termală şi cu arsen în roci. Nivelul mediu al arsenului în apele de băut şi în cele de adâncime în Germania este de sub 10 μg/l. Concentrațiile arsenului în apele marine sunt, în general între 1 şi 8 μg/l.

2. Produse comerciale: conservanți ai lemnului, insecticide, erbicide, fungicide, vopsele şi pigmenți.

3. Alimente: vin (struguri stropiți cu pesticide pe bază de arsen), tutun, peşti şi fructe de mare (în special bivalve şi peşti care trăiesc şi se hrănesc cu sediment, alge marine) şi produse de origine animală provenite de la animale intoxicate cu arsen. Conținutul de arsen al plantelor este determinat de expunerea la arsen via sol, apă, aer, fertilizanți şi alte produse chimice, originea geologică a solului şi specie, partea din plantă şi vârsta acesteia. Concentrațiile pot diferi, iar plantele care cresc pe terenurile bogate în arsen pot acumula concentrații mult mai mari. Majoritatea produselor vegetale conțin mai puțin de 0,3 mg/kg şi rareori depăşesc 1 mg/kg substanță uscată, în timp ce algele marine pot avea concentrații foarte mari de arsen organic (40-50 mg/kg substanță uscată). Pe baza datelor limitate existente până în prezent, s-a estimat că procentul de arsen anorganic este de 75% în carne şi produse lactate şi 65% în cereale.

4. Procese industriale: purificarea gazelor industriale (îndepărtarea sulfului), arderea combustibililor fosili, arderea lemnului tratat cu conservanți pe bază de arsen, producerea de electronice (componente pentru aparate cu microunde, lasere, diode, celule fotoelectrice, semiconductori), sticlărie şi ceramică, aliaje cu plumb.

5. Terapie: antiparazitare, medicamente (pentru tratarea leucemiei, psoriazisului şi astmului). Unii compuşi organici ai arsenului (de exemplu acidul arsalanic) au fost utilizați ca şi aditivi furajeri pentru controlul unor boli şi îmbunătățirea creşterii greutății corporale la porci şi păsări în concentrații de 100 mg/kg furaj, dar utilizarea lor în Europa a fost interzisă, nu însă şi în alte țări de pe alte componente.

Toxicitatea arsenului

Toxicitatea compuşilor cu arsen este diferită la mamifere, în funcție de valență, formă (anorganică sau organică), starea fizică (gaz, soluție sau pulbere) şi factori ca solubilitatea, mărimea particulelor, rata de absorbție şi eliminare şi prezența impurităților. Arsenul anorganic este în general mai toxic decât cel organic. Totuşi studiile pe animale au arătat că metil şi fenil arsenații pot produce efecte asupra sănătății similare cu cele produse de arsenul anorganic. Toxicitatea arsenului trivalent este de câteva ori mai mare decât a arsenului pentavalent, datorită aportului celular mai mare. Arsenul metalic este considerat în general netoxic, datorită

insolubilității sale în apă şi fluidele corpului. Rumegătoarele prezintă semne de toxicitate doar la expunere de 200-300 mg arsen anorganic/kg rație. Porcii hrăniți cu 100 mg arsen din acid arsalanic/kg rație prezintă apetit redus. Găinile ouătoare îşi reduc consumul de furaje cu până la 20% când sunt hrănite cu o rație care conține 44 mg arsen din acid 3-nitro-4-fenilarsenic/kg rație. Greutatea oului a fost redusă când în rație a fost introdus arsenul sub formă de trioxid de arsen, 15 mg/kg rație. Efectele toxice la peşti după expunerea prin rație la concentrații de arsenat între 32-160 mg/kg rație includ niveluri crescute ale metalotioneinelor hepatice, alterări histopatologice ale ficatului şi vezicii urinare şi rată redusă de creştere. Dimpotrivă nu a fost observat nici un efect toxic la peştii expuşi la concentrații de 10 ori mai mari de arsen organic.

NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) stabilit pentru populația umană este de 0,0003 mg/kg greutate corporală/zi. Doza zilnică tolerabilă săptămânal pentru arsenul anorganic stabilită este de 0,015 mg/kg greutate corporală/săptămână. Studiile realizate în diferite țări europene au arătat că aportul mediu zilnic de arsen prin hrană este de aproximativ 0,065 mg arsen total/zi/persoană.

Toxicocinetica

Aportul oral zilnic de arsen anorganic a fost estimat între 1-20 μg iar de arsen sub toate formele de 40 μg.

Dintre alimente carnea, peştele, fructele de mare, orezul şi ciupercile conțin concentrațiile cele mai mari de arsen. Peştele, fructele de mare şi algele conțin arsen sub formă de arsenobetaină şi arsenocolină, produse adesea menționate ca „peşte arsenic". Acest arsen prezintă toxicitate redusă pentru om şi este rapid excretat prin urină. Vinul făcut din struguri stropiți cu pesticide pe bază de arsen poate conține cantități apreciabile de arsen.

Compuşii arsenului ce pătrund în corp pe cale orală sunt absorbiți la nivelul tractului gastrointestinal. Absorbția depinde de forma fizică a compusului, solubilitate, pH-ul gastric, motilitatea gastrointestinală şi biotransformările microbiene din intestin. Absorbția formelor solubile la om variază între 60-90%.

Forma arsenului care predomină în aer este cea de trioxid de arsen şi în funcție de mărimea particulelor absorbția va avea loc fie până în tractul respirator inferior fie până în căile respiratorii superioare unde vor rămâne particulele până vor fi înghițite de clearance-ul mucociliar.

După absorbția din plămâni sau tractul gastrointestinal, arsenul se acumulează inițial în ficat, splină, rinichi, plămâni şi tractul gastrointestinal. După 2-4 săptămâni după ce expunerea încetează majoritatea arsenului rămas în organism este regăsit în țesuturile bogate în cheratină ca părul, pielea şi unghiile. La om a fost semnalat şi transferul placentar.

Metabolizarea

In vivo au loc reacții de oxido-reducere rezultând interconversia arsenului pentavalent şi trivalent, îngreunând distincția dintre aceste două categorii de compuşi arsenici anorganici. O parte din arsenul trivalent este metilată, mai ales în ficat, la acid metilarsenic şi acid dimetilarsenic. Acest proces reprezintă principalul mecanism de detoxifiere al organismului deoarece produşii care rezultă sunt mai uşor de excretat şi mai puțin toxici. La doze mari de

arsen însă eficiența acestui proces scade deoarece se ajunge la depășirea capacității de metilare a ficatului iar arsenul ajunge să fie reținut de către țesuturile moi. Acest lucru poate fi îmbunătățit şi anume prin tratarea cu cantități mici de arsen pe o perioadă lungă de timp se măreşte eficiența metilării la aplicarea subsecventă a unei cantități mari de arsen. Aceasta a fost studiată pe culturi celulare şi arată că procesul de metilare este unul inductibil. Arsenul din „peştele arsenic” nu este metabolizat in vivo, ci este rapid excretat nemodificat prin urină.

Eliminarea

Studiile arată că 6 până la 9 procente din As administrat oral este eliminat prin fecale, indicând absorbția aproape completă din tractul gastrointestinal. Excreția arsenului absorbit este în principal prin urină. Viața biologică a arsenului anorganic ingerat este de aproape 10 ore şi 50 până la 80 procente excretat în aproape 3 zile. Acesta are o predilecție pentru piele şi este excretat prin descuamarea pielii şi prin transpirație în special în perioadele de transpirație abundentă. Se concentrează de asemenea în unghii şi păr. Arsenul în unghii produce linii Mee (benzi albe transversale pe unghii) apărând aproape după 6 săptămâni după apariția simptomelor toxicității. Timpul expunerii poate fi estimat prin măsurarea distanţei de la linie până la baza unghiei şi rata creşterii unghiei care este de aproape 0,3 cm pe lună sau 0,1 mm pe zi.

Transferul placentar a fost arătat la hamsterii injectați intravenos cu doze mari de arsenat de sodiu şi studiile nivelelor de arsen din țesut la fetuşi şi nou născuți din Japonia arată că totalul cantității de arsen din făt tinde să crească în timpul gestației indicând transfer placentar.

Biotransformarea

Biotransformarea arsenului a fost dificil de studiat datorită problemelor analitice. Compuşii arsenului pentavalent sunt reduşi în vivo la compuşi mult mai toxici trivalenți. Cu toate acestea ingerarea arsenului trivalent de animalele folosite pentru experimente şi de oameni este urmată de excreția unui anumit procentaj din doza administrată ca arsen pentavalent.

Efecte patogene

Toxicitatea arsenului prezintă două mecanisme prin care afectează respirația celulară. Astfel într-un prim mecanism arsenul se leagă la grupările sulfhidril blocând enzimele sulfhidrice. Ca rezultat, sunt inhibate căile oxidării piruvat şi succinat şi ciclul acidului tricarboxilic, împiedicând gluconeogeneza şi reducând fosforilarea oxidativă. De acest efect este răspunzător arsenul trivalent.

Cel de-al doilea mecanism implică substituirea arsenului pentavalent cu fosforul în multe reacții biochimice. Înlocuirea anionului stabil de fosfor în fosfat cu anionul arsen pentavalent mai puțin stabil duce la hidroliza rapidă a legăturilor bogate în energie în compuşi ca ATP. Aceasta duce la pierderea legăturilor înalt energetice fosfat, „decuplând” fosforilarea oxidativă.

Arsenul gazos, spre deosebire de celelalte forme, produce un sindrom hemolitic. După inhalare, arsenul se fixează pe hematii producând leziuni celulare-membranare ireversibile. În doze mici, arsenul este un hemolitic puternic, determinând hemoliză intravasculară dependentă de doză. În doze mari, arsenul produce citotoxicitate directă multiplă.

După ingerare şi absorbție, arsenul produce răni celulelor din sistemul nervos, vaselor de sânge, ficatului, rinichilor şi altor țesuturi.

Efecte celulare. Este cunoscut de câțiva ani faptul că arsenul sub forma compuşilor trivalenți reprezintă principala formă toxică şi compuşii pentavalenți au un efect foarte mic asupra activității enzimelor. La expunerea la arsen s-a descoperit că sunt alterate un număr de proteine conținând grupaea sulfhidril şi un număr de sisteme enzimatice. Unele dintre acestea pot fi refăcute prin adăugare de monotioli cum ar fi glutationul; enzimele care conțin două gripări tiolice pot fi refăcute cu ajutorul ditiolilor cum ar fi 2,3-dimercaptopropanol dar nu şi monotioli.

Arsenul afectează enzimele mitocondriale şi împiedică respirația țesuturilor care pare să fie legată de toxicitatea celulară a arsenului. Mitocondria acumulează arsen şi respirația mediată de NAD este în mod special sensibilă la arsen. Mitchell a propus că arsenul inhibă funcțiile legate de energie ale mitocondriei în două moduri: competiția cu fosfat în timpul fosforilării oxidative şi inhibiția reducerii energetice a NAD.

La nivelul tractului gastrointestinal, leziunile produse de arsen determină creşterea permeabilității capilarelor, ducând la pierderea de fluid şi hipotensiune. Inflamarea şi necroza progresivă a mucoasei şi submucoasei stomacului şi intestinuli pot duce la perforarea peretelui intestinal şi cu manifestări de gastroenterită hemoragică.

Efecte renale şi hepatice. Intoxicația cu arsen poate duce, de asemenea şi la toxicitate hepatică, incluzând hepatită toxică şi niveluri ridicate ale enzimelor hepatice. Din necropsiile copiilor japonezi intoxicați cu lapte contaminat cu arsen au fost relevate necroze hepatice

hemoragice şi degenerescență grasă a ficatului. Aportul cronic de arsen poate duce la hipertensiune portală cirotică.

Toxicitatea sistemică produsă în intoxicația acută cu arsen poate fi însoțită de necroza tubulară acută şi insuficiență renală acută. Cauzele rănilor pot fi şocul hipotensiv, rănirile hemoglobinurice sau mioglobinurice tubulare sau efectele directe ale arsenului asupra celulelor tubulilor. Afecțiunile glomerulare pot determina proteinurie.

Intoxicația acută poate determina fisuri capilare difuze, care conduc la vasodilatație generalizată, transudații ale plasmei, hipotensiune şi şoc.

Ingestia cronică a arsenului prin apa de băut a condus la modificări vasculare periferice pronunțate. Evidențele epidemiologice au indicat că expunerea cronică la arsen este asociată cu spasmul vascular şi insuficiență vasculară periferică.

Intoxicația acută cu arsen este legată şi de toxicitatea neurologică manifestată prin neuropatie periferică, implicând nervii senzitivi şi motori. Efectele senzoriale, ca disestezia dureroasă, apar devreme şi pot predomina în intoxicația moderată, în timp ce în intoxicația mai severă apare slăbiciunea progresivă şi paraliziile. Nervii cranieni sunt rar afectați, chiar şi în intoxicațiile acute.

Neuropatia este datorată distrucțiilor axonilor neuronali. Recuperarea după neuropatiile induse la expunerea cronică la arsen este, în general, lentă, durând uneori ani, fără să se producă recuperarea completă. Studiile realizate asupra copiilor japonezi care au consumat cronic lapte contaminat cu arsen, au relevat o incidență crescută a pierderii auzului, retardare mentală, epilepsie şi alte afecțiuni ale creierului.

Expunerea oamenilor la arsen determină şi apariția afecțiunilor dermatologice, cele mai frecvente fiind hiperpigmentarea, hipercheratoza şi cancerul de piele. Petele hiperpigmentate pot să apară pe tot corpul, dar apar mai ales pe pleoape, tâmple, axile, gât şi regiunea inghinală. În cazurile severe, pigmentațiile se extind pe piept, spate şi abdomen. Modificările pigmentare au fost observate la oamenii expuşi cronic la mai mult de 400 ppb arsen prin apa de băut.

Hipercheratoza arsenioasă apare mai frecvent pe palme şi tălpi.

Atât intoxicația acută cât şi cea cronică cu arsen pot afecta sistemul hematopoetic. Se poate produce supresarea măduvei osoase cu pancitopenie.

Anemia şi leucocitopenia sunt frecvente în intoxicația cronică cu arsen .

Toxicologie

Ingestia unor doze mari (70 până la 180 mg) poate fi de fapt fatală. Simptomele constau în febră, anorexie, hepatomegalie şi aritmie cardiacă. Ingestia acută poate conduce la iritații la nivelul mucoaselor şi formarea de vezicule. Afectarea sistemului nervos periferic este efectul neurologic cel mai comun instalându-se la una sau două săptămâni după expunerea la doze mari ce presupune degenerarea axonilor, aceasta fiind reversibilă dacă expunerea este oprită.

Pielea este organul critic al toxicității arsenului şi o varietate de leziuni ale pielii au fost asociate cu intoxicația cu arsen. Cancerul de piele datorat expunerii la arsen a fost prima dată raportat de un terapeut englez, Sir Jonathan Hutchinson la persoanele cu o îndelungată ingerare a soluției Fowler.

Simptomatologie

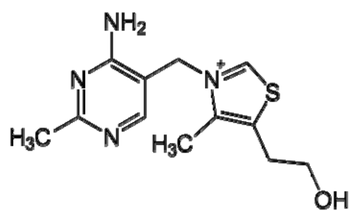
Simptomele apar de obicei la o oră după ingestie, dar pot întârzia câteva ore. Mirosul aliaceu al respirației şi al fecalelor, pot să apară la pacienții cu intoxicații grave. În intoxicația cu arsen predominante sunt efectele gastrointestinale, între care voma, durerile abdominale şi diareea apoasă sau hemoragică, sunt cele mai frecvente. Printre efectele gastrointestinale se întâlnesc şi inflamația, formarea de vezicule şi eventual desprinderi ale mucoaselor din gură, faringe şi esofag. Acestea sunt rezultatul acțiunii unui metabolit arsenios asupra vaselor de sânge, determinând vasodilatație şi permeabilitate capilară crescută. Afectat în intoxicația acută este şi sistemul nervos central, unde simptomele care apar sunt dureri de cap, stare de disconfort, somnolență şi confuzie. Simptomele pot progresa şi includ slăbiciunea musculară şi spasme, hipotermia, letargia, delirul, coma şi convulsiile.

Afecțiunile renale se manifestă sub formă de proteinurie, hematurie, glucozurie, cilindri urinari şi, în intoxicațiile severe, necroze tubulare.

Manifestările cardiovasculare includ şocul, cianoza şi aritmiile cardiace, datorate acțiunii toxice directe şi tulburărilor electrolitice. Afecțiunile hepatice pot fi manifestate prin niveluri enzimatice ridicate şi icter, iar afectarea țesuturilor hemato-formatoare poate determina anemie, leococitopenie şi trombocitopenie.

Moartea survine, de obicei, după 1-3 zile de la debutul simptomelor, adesea ca rezultat al insuficienței circulatorii şi renale. Pacienții care supraviețuiesc prezintă parestezii dureroase, furnicături şi amorțeli în mâini şi picioare, slăbiciune musculară şi spasme.

Hiperpigmentarea şi hipercheratoza sunt semne tipice ale intoxicației cu arsen. Alte semne ale intoxicației cronice cu arsen cuprind edeme subcutanate ale feței, pleoapelor şi gleznelor, stomatite, striații albe pe unghii şi uneori căderea unghiilor sau părului. Uneori papulele hipercheratozice suferă transformări maligne. La fel de frecvente sunt însă şi simptomele neurologice. Printre ele se află şi neuropatia periferică ce se manifestă prin parestezie, durere, anestezie, pareze şi ataxie. Pot debuta adesea cu simptome senzitive în extremitățile inferioare şi progresa la slăbiciune musculară şi, eventual, paralizii şi atrofie musculară. Se poate produce şi encefalopatia, nu atât de comună însă, manifestată prin tulburări de vedere şi tulburări mentale, foarte asemănătoare cu cele întâlnite în deficiența de tiamină.



Tiamina

Efecte cele mai tardive ale aportului cronic de arsen sunt cancerul de piele, de pulmoni şi de vezică urinară.

Expertiza produselor alimentare şi măsuri pentru protecția consumatorului

În cazul sacrificărilor de necesitate ale animalelor intoxicate cu arsen se confiscă organele, tubul digestiv, capul şi mamela, indiferent dacă sunt sau nu corespunzătoare

organoleptic. Carnea va fi supusă examenului toxicologic de laborator, iar cea care depăşeşte limitele maxime admise şi prezintă modificări organoleptice se confiscă. Animalele de talie mică intoxicate cu arsen se vor exclude de la consum.

La animalele mari nu se permite consumul îndelungat deoarece există riscul acumulării lente de arsen şi declanşarea intoxicațiilor la om.

Laptele provenit de la vacile intoxicate, cu evoluție subacută sau cronică trebuie retras din consum uman cel puțin 20 de zile, deoarece laptele este o cale de eliminare importantă pentru arsen. Atunci când conține doar urme neglijabile de arsen, laptele se dirijează spre fabricarea untului. Ouăle se vor supune de asemenea analizelor de laborator, excluzându-se din consum cele care depăşesc limitele maxime admise. Limitele admise de arsen din unele produse alimentare sunt prezentate în tabelul 2:

Tabel 2. Concentrații admise de arsen

Produs	Concentrație (mg/kg)
Dulciuri, dropsuri, ciocolată, halva, cacao	0,2
Cartofi	0,3
Legume proaspete sau congelate	0,5
Fructe proaspete sau congelate	0,5
Sucuri, băuturi alcoolice naturale	0,1
Condimente	0,2
Cafea	0,2

Mercurul

Niciun alt metal nu ilustrează mai bine diversitatea efectelor cauzate de diferitele forme biochimice. La baza caracteristicilor toxicologice sunt 3 forme ale mercurului: elementală, anorganică şi organică. Sursa majoră de mercur provine din degazarea naturală a crustei pământului. Mercurul metalic din atmosferă reprezintă principala cale din transportul global al mercurului.

Toxicocinetica

Toxicitatea diverselor forme sau săruri ale mercurului este dată de mercurul cationic pe când solubilitatea, biotranformarea şi distribuția în țesuturi sunt influențate de starea de valență şi de componenta anionică. Mercurul metalic sau elemental volatilizează la temperaturi ambientale şi majoritatea expunerilor de la oameni se fac prin inhalare. Vaporii de mercur difuzează de-a lungul membranei alveolare şi este liposolubil încât are o afinitate pentru celulele roşii şi pentru sistemul nervos central. Mercurul metalic poate fi inghițit dintr-un termometru spart şi este absorbit foarte lent de tractul gastrointestinal şi este deseori considerat a nu avea vreo consecință toxică.

Sărurile de mercur anorganic pot fi divalente (mercurice) şi monovalente (mercuroase). Absorbția gastrointestinală a sărurilor de mercur anorganic din hrană reprezintă mai puțin de 15% la şoareci şi aproximativ 7% într-un studiu la oameni voluntari pe când absorbția

metilmercurului este de ordinul a 90-95%. Distribuția între celulele roşii şi plasmă diferă de asemenea.

Rinichii conțin cea mai mare concentrație de mercur ca urmare a expunerii la sărurile anorganice ale mercurului şi mercur vapori, pe când mercurul organic are o afinitate deosebită pentru creier, în special pentru cortexul posterior. Cu toate acestea mercurul sub formă de vapori are o mai mare predilecție pentru sistemul nervos central decât are mercurul anorganic dar mai mică decât mercurul organic.

Excreția mercurului din organism se face prin intermediul urinei sau fecalelor, în funcție de specia de mercur, doză şi timpul de expunere. Expunerea la vapori de mercur este urmată de eliminarea unei părți mici prin expirație, dar excreția reprezintă partea majoră şi este predominantă inițial după expunerea la mercur anorganic. Excreția renală creşte cu timpul. Aproximativ 90% din metilmercur este excretat după expunerea acută sau cronică şi nu se modifică cu timpul.

Toate formele mercurului traversează placenta ajungând la făt. Preluarea mercurului de către făt la şobolani probabil datorită liposolubilității este de 10-40 de ori mai mare decât absorbția sa după expunerea la sărurile anorganice. Concentrația mercurului în fetus, după expunerea la compuşii alchil mercurici este de 2 ori mai mare față de cea găsită în țesutul matern, iar nivelul de metilmercurului în celulele roşii fetale este cu 30% mai mare decât în celulele roşii materne. Gradientul fetal-matern pozitiv şi concentrația crescută a mercurului în celulele roşii ale fătului măresc toxicitatea fetală la mercur în special după expunereala alchil mercur. Cu toate că laptele matern poate conține doar 5% din concentrația mercurului a sângelui matern expunerea neonatală la mercur poate fi mărită prin alăptare.

Transformarea metabolică şi excreția

Mercurul elemental este oxidat la mercur divalent după absorbția la țesuturi în organism, mediat de catalaze. Vaporii de mercur inhalați şi absorbiți de celulele roşii sunt transformați în mercur divalent dar o porțiune este de asemenea transportată ca mercur metalic la mai multe țesuturi distale, în mod particular creierul unde se pot produce biotransformări. Similar o fracțiune din mercurul metalic absorbit poate fi transportat prin placentă până la făt. Mercurul oxidat divalent este apoi acumulat de aceste țesuturi.

Alchilmercurul este de asemenea supus biotranformării la compuşi mercurici divalenți în țesuturi prin clivarea legăturii carbon-mercur. Nu este nici o dovadă a formării nici unei forme organice a mercurului de către țesuturile mamare. Compuşii aromatici sunt convertiți la mercur anorganic mai rapid decât cel mai scurt lanț al compuşilor alchil. În situațiile în care mercurul organic este mai rapid absorbit decât cel anorganic, crescând rata biotransformării va scădea rata de excreție. Fenil şi metoxietil mercurul sunt excretate cam cu aceeaşi viteză ca şi cel anorganic pe când excreția metil mercurului este mai lentă.

Metabolismul celular

În interiorul celulelor, mercurul se poate lega de diferite sisteme enzimatice printre care şi cele ale microzomilor şi ale mitocondriei producând afectarea nespecifică a celulelor şi chiar moartea lor. Are o afinitate particulară pentru liganzii ce conțin grupări sulfhidril. În celulele din

ficat metil mercurul formează compuşi complecşi solubili cu cisteina şi glutationul care sunt secretate în bilă şi reabsorbite din tractul gastrointestinal.

Vaporii de mercur

Inhalarea vaporilor de mercur poate produce o bronşită acută şi corozivă, iar dacă nu produce moartea poate fi asociată cu simptome ale efectelor asupra sistemului nervos central cum ar fi tremurul sau excitabilitatea crescută.

Efectele majore ce apar la expunerea cronică la vaporii de mercur sunt la nivelul sistemului nervos central. Semnele sunt nonspecifice şi au fost denumite „sindromul astenic vegetativ" sau „micromercurialism". Identificarea sindromului necesită simptome neuroastenice şi trei sau mai multe dintre următoarele diagnosticări clinice: tremur, mărirea tiroidei, puls labil, tahicardie, gingivită, schimbări hematologice sau excreția mărită a mercurului în urină. O dată cu expunerea crescută, simptomele devin caracteristice începând cu tremurul intenționat al muşchilor care îndeplinesc funcțiile motorii, cum ar fi degetele, pleoapele şi buze şi pot ajunge la un tremur generalizat al întregului corp şi spasme cronice violente ale extremităților. Acestea sunt însoțite de schimbări de personalitate şi comportament, cu pierderi de memorie şi chiar delir sau halucinații. O altă caracteristică a toxicității mercurului este salivarea severă şi gingivită.

Triada excitabilității crescute, tremurul şi gingivita a fost recunoscută istoric ca manifestarea majoră a otrăvirii cu mercur prin inhalarea vaporilor şi expunerea la nitratul de mercur din industria blănurilor şi pălăriilor.

Mercurul mercuric

Clorura mercurică ($HgCl_2$) este cea mai cunoscută sare a mercurului anorganic şi numele său sugerează efectul său aparent toxicologic la ingerarea în concentrații mai mari de 10%. Efectele ingerării acestei săruri sunt: ulcerații corozive, sângerări şi necroza tractului gastrointestinal. Acestea sunt însoțite de obicei de şoc şi colapsul circulator. Dacă pacientul supraviețuieşte daunelor gastrointestinale, blocajul renal apare în 24 de ore datorită necrozei epiteliului tubular proximal. Regenerarea celulelor de aliniere tubulare poate fi posibilă dacă pacientul poate fi menținut în viață de dializă.

Injectarea clorurii mercurice produce necroza epiteliului rinichiului. Schimbările celulare includ fragmentarea şi întreruperea plasmei membranare şi anexelor sale, vezicularea şi întreruperea reticulului endoplasmatic şi a altor membrane citoplasmatice, disocierea polizomilor. Aceste schimbări sunt comune necrozei celulelor renale datorate diverselor cauze.

Deşi expunerea la o doză mare de clorură mercurică este direct toxică pentru celulele renale tubulare, expunerea cronică la doze scăzute la sărurile mercurice pot induce o boală imunologică glomerulară. Persoanele expuse pot dezvolta o proteinurie care este reversibilă după ce muncitorii sunt îndepărtați de locul în care a avut loc expunerea. Studiile experimentale au arătat că patogeneza neuropatiei cronice cauzată de mercur are 2 faze: o fază de început caracterizată de o membrană antisubsolică glomerulonefrită urmată de un complex glomerulonefritic imun superimpus. Nefrita glomerulară de început poate progresa la oameni până la un complex nefritic interstițial imun.

Compuşii mercuroşi

Compuşii mercuroşi ai mercurului sunt mai puţin corozivi şi mai puţin toxici decât sărurile, probabil din cauza solubilităţii mai scăzute. Calomelul (Hg_2Cl_2), o pudră conţinând clorură mercuroasă, are o istorie lungă de utilizare în medicină. Probabil cea mai notabilă utilizare a fost pudra pentru creşterea dinţilor la copii şi este cunoscută a fi responsabilă de acrodinie şi „boala roz”. Aceasta este cel mai probabil un răspuns de hipersensibilitate la sărurile de mercur, în piele producând vasodilataţie, hipercheratoză sau hipersecreţia glandelor sudoripare. Copiii dezvoltă febră, o urticarie roz, umflarea splinei şi hipercheratoză şi umflarea degetelor. Efectele sunt independente de doză şi se cred a fi reacţii de hipersensibilitate.

Mercurul organic

Metilmercurul este forma cea mai importantă în termeni de toxicitate, iar efectele din expunerea din mediul înconjurător şi multe efecte produse de lanţurile scurte de alchil sunt unice în termeni de toxicitate a mercurului dar sunt nespecifice în aceea că pot fi găsite în alte stări ale bolilor. Majoritatea lucrurilor care sunt cunoscute despre toxicitatea mercurului metilic este din studiile epidemiologice ale populaţiei expuse.

Două epidemii majore ale otrăvirii cu metilmercur s-au petrecut în Japonia în Golful Minamata şi în Niigata. Amândouă au fost cauzate de eliberarea industrială a compuşilor mercurici în Golful Minamata şi în râul Agano urmată de acumularea mercurului de peştii comestibili. Nivelul mediu al mercurului total în peştii prinşi în Golful Minamata în timpul epidemiei a fost de aproximativ 11 mg/kg greutate proaspătă şi mai puţin de 10 mg/kg în peştii din râul Agano. Cea mai mare epidemie de otrăvire cu mercur metilic a fost înregistrată în Iraq în iarna anilor 1971-1972 rezultând în internarea a peste 6000 de pacienţi şi a peste 500 de morţi în spitale. Expunerea la metilmercur a fost datorată pâinii conţinând grâu importat „îmbrăcat” cu fungicide ce conţineau metilmercur. Conţinutul de metilmercur din probele de făină a fost 0,1 mg/kg.

Din studiile acestor epidemii au fost obţinute date în legătură cu manifestările clinice, patologia organelor şi nivele de expunere. Majoritatea manifestărilor clinice sunt legate de sistemul nervos constând în ataxie, dizartrie şi surzenie apărând în această ordine. Principalele trăsături patologice ale toxicităţii mercurului metilic includ degenerarea şi necroza neuronilor în arii focale ale cortexului cerebral, în special în ariile vizuale ale cortexului occipital şi în stratul granular al cerebelului. Studiile experimentale ale mercurului organic şi a celui anorganic arată degenerarea a celulelor ganglionare primare senzoriale. Distribuţia particulară a leziunilor în sistemul nervos central se crede a reflecta tendinţa mercurului de a deteriora celulele nervoase mici din cerebel şi cortexul vizual.

Mercurul metalic

Pentru populaţia generală expunerea zilnică la mercur este estimată a fi 1 μg/zi din aer, mai puţin de 2 μg/zi din apă şi aproape 20 μg/zi din hrană, dar poate ajunge până la 75 μg/zi în funcţie de cantitatea de peşte din dietă. Limita permisă în expunerea cu mercur anorganic la locul de muncă este de 0,05 mg Hg/m^3 şi este echivalent cu un nivel de 0,015 mg/m^3 din aerul ambiant pentru populaţia generală.

Sistemul nervos central este principalul loc afectat de toxicitatea mercurului. Se crede că un muncitor expus la o concentrație medie constantă de vapori de mercur atinge o stare stabilă după un an de expunere şi se poate aştepta să existe relație între nivelul mercurului în aer şi conținutul de mercur din sânge sau urină. Conținutul de mercur din sânge şi urină reflectă doar expunerea recentă la mercur metalic.

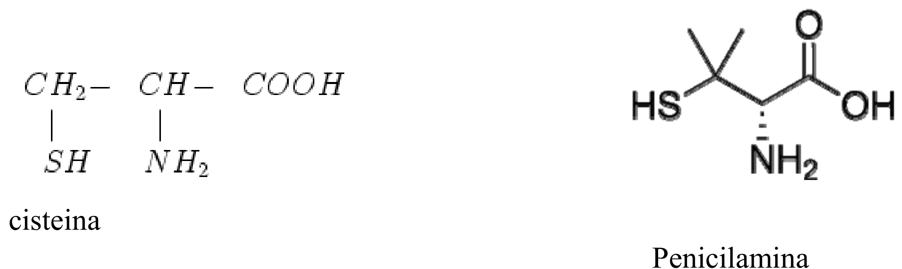
Alchil mercurul

Standardul pentru expunerea la mercurul alchilic la locul de muncă este de 0,01 mg/m^3. Nivelele de mercur din păr pot fi corelate cu severitatea simptomelor clinice. Cazurile uşoare presupun amorțeala extremităților, tremurături uşoare şi o uşoară ataxie. Cazurile moderate prezintă dificultăți de auz, paralizie parțială şi cazurile severe o combinație de paralizie totală, pierderea vederii, pierderea auzului, pierderea vorbirii şi comă. Persoanele fără niciun simptom pot avea nivelele de mercur din păr până la 300 mg/kg, cele afectate moderat pot avea între 120 şi 600 mg/kg iar cele sever afectate au între 400 şi 1600 mg/kg.

Nu este înțeles în totalitate de ce expunerea la mercurul metilic are efecte atât de selective asupra cerebelului şi cortexului vizual. Concentrația de mercur din aceste zone ale creierului nu este foarte diferită de aceea din celelalte zone ale creierului care nu sunt afectate de mercurul metilic. Mercurul metilic inhibă sinteza proteinelor înainte de instalarea semnelor otrăvirii şi s-a arătat că refacerea sintezei proteinelor nu are loc în celulele granulare ca în celelalte celule nervoase.

Tratament

Terapia în otrăvirea cu mercur ar trebui să fie direcționată în diminuarea concentrației de mercur în organele critice sau în locul afectat. Pentru cele mai severe cazuri, în special în cedarea renală acută, hemodializa poate fi prima măsură luată împreună cu infuzia de agenți chelanți pentru mercur cum ar fi cisteina sau penicilamina. Pentru cazurile mai puțin severe cu otrăvirea cu mercur anorganic, chelarea cu BAL poate fi eficientă. Cu toate acestea, terapia chelantă nu este foarte utilă la expunerea la mercuric alchilic. Excreția biliară şi reabsorbția de către intestin şi ciclizarea enterohepatică a mercurului pot fi întrerupte prin drenarea vezicii biliare în mod chirurgical sau prin administrarea pe cale orală a unei răşini de tiol neabsorbabilă care leagă mercurul şi măreşte excreția intestinală.



cisteina

Penicilamina

Expertiza produselor alimentare

În produsele şi subprodusele de origine animală provenite de la animale intoxicate sau tratate cu compuşi ai mercurului, reziduurile presistă mult timp, astfel că sacrificarea animalelor

se recomandă să se realizeze după 9-10 luni de la remisie sau după încetarea aplicării tratamentului. În cazul intoxicațiilor, pericol pot prezenta şi laptele şi ouăle, acestea fiind căi de eliminare pentru mercur.

Deoarece metil mercurul din peşte şi produse din peşte reprezintă până la 85% din aportul total de mercur prin rație, pentru a asigura protecția consumatorilor au fost stabilite nivele maxime admise pentru mercur în peşte. Limita maximă admisă pentru mercur în peştii nerăpitori este de 0,5 mg/kg, în timp ce peştii răpitori pot conține până la 1 mg/kg. Limita fixată de Comisia Europeană pentru Furaje este de 0,1 mg/kg pentru toate animalele, cu excepția animalelor de companie, în rația cărora se tolerează până la 0,4 mg/kg.

Pentru apa de băut, limita maximă este de 1 µg/l.

Pentru muncitorii expuşi profesional, OSHA (Occupational Safety and Health Administration) a mpus o limită de 1,2 ppb mercur organic în aerul din încăpere (echivalent cu 0,01 mg/m^3) şi 6,1 ppb (0,05 mg/m^3) pentru mercurul anorganic pentru a proteja muncitorul pe durata a 8 ore de muncă,

Deoarece metilmercurul se găseşte mai ales în țesutul muscular al peştelui legat de proteine, îndepărtarea pielii şi a grăsimii nu reduce semnificativ concentrația mercurului din muşchi. Gătitul, de asemenea, nu îndepărtează mercurul din muşchi ci, dimpotrivă, deoarece umiditatea scade după gătit, concentrația mercurului ajunge să fie chiar mai mare decât în peştele proaspăt.

În ceea ce priveşte produsele de origine vegetală, o atenție deosebită se recomandă să se acorde culturilor din zonele din jurul fabricilor care eliberează mercur în mediu şi ciupercilor, care sunt acumulatoare de mercur.

Pentru a reduce contaminarea mediului, în special a ecosistemelor acvatice, apele reziduale care se ştie că pot conține mercur se supun unor tratamente speciale pentru a-l îndepărta. Se utilizează materiale absorbante cum sunt cărbunele din lemn, cărbunele activat de cocos, chitosam, zgură granulată de la oțelării pentru a îndepărta mercurul ionic şi unele bioreactoare, care sunt eficiente în proporție de 97%. Pentru a scădea toxicitatea apelor reziduale, în special de la fabricile de sodă, au fost utilizate şi bacterii rezistente la mercur. Algele albastre-verzi acumulează cantități substanțiale de mercur din mediu, în timp ce tulpinile rezistente de bacterii volatilizează peste 90% din mercur organic şi anorganic. Tulpinile de *Streptomyces termofile* pot stimula reducerea concentrației mercurului anorganic din apă.

Nichelul

Nichelul este un metal de culoare alb-argintie, ductil şi rezistent la coroziune. A fost descoperit în 1751 în Suedia de Axel Fredik Cronstedt. Este folosit ca aliaj în oțelul inoxidabil şi în monede. Este de asemenea folosit şi pentru placarea metalică a bateriilor, dar şi pe post de catalizator în procesele chimice.

Distribuția în alimente

Nichelul poate fi găsit în aproape toate alimentele. Cele mai mici concentrații se găsesc de obicei în produsele animale şi lapte. Cerealele şi fructele conțin concentrații intermediare din

acest metal iar cele mai mari nivele se găsesc de exemplu în cacao. Majoritatea conținutului de nichel din dietă provine probabil din contaminarea din timpul procesării şi preparării. Încălzitoarele electrice pentru apă pot constitui o sursă considerabilă de nichel în dietă. Studii din Danemarca şi Suedia au arătat că încălzitoarele placate cu Ni sau cu elemente din oțel inoxidabil pot da apei fierbinți până la 1 mg Ni/l.

Tabel 3. Concentrații ale Ni în alimente necontaminate

Alimente	Concentrație Ni (mg/kg)
Carne, peşte, lapte, ficat şi rinichi	≤0,02
Fructe şi legume, cereale	≤0,1
Ciocolata cu lapte,ciuperci	≤1
Cacao, seminţe, fasole	1-5

Absorbția Ni din alimente se estimează a fi în proporție de 0,7 % pe când Ni din băuturi este absorbit mult mai eficient, mai ales dacă este ingerat pe stomacul gol.

Efectele toxice sunt datorate în principal expunerii ocupaționale sau accidentale şi nu prin alimente. Nichelul este un carcinogen al tractului respirator pentru muncitorii din industria rafinării nichelului. Alte consecințe serioase pe termen lung nu sunt aşa de evidente, dar sunt severe şi acute şi câteodată pot fi fatale la expunerea nicheltetracarbonil. Dermatita alergică este comună la persoanele din populația generală. Totuşi, deficiența nichelului alterează metabolismul glucozei şi scade toleranța la glucoză. Din studiile făcute pe şobolani s-a dovedit că nichelul poate fi un metal esențial de urme pentru mamifere.

Toxicodinamie

Nichelul este numai slab absorbit de tractul gastrointestinal. Este transportat în plasmă fiind legat de albumina serică şi mulți alți liganzi organici, aminoacizi sau polipeptide. Excreția prin urină este aproape completă în 4-5 zile. Aportul de nichel din dietă la adulții din Statele Unite ale Americii a fost estimat la 300 până la 600 μg/zi. Într-un studiu mai recent a conținutului de nichel din mâncarea pregătită în bucătăriile universităților şi ale spitalelor s-a găsit un aport de nichel a fi de 165 μg/zi sau 65-85 μg/1000 de calorii.

Nichelul administrat parenteral la animale este rapid distribuit la rinichi, plămâni, piele, glanda pituitară. Distribuția intracelulară şi legarea nichelului nu este bine cunoscută. Liganzii ultrafiltranți par a fi de mare importanță în transportul în ser şi în bilă, în excreția urinară cât şi în legarea intracelulară.

Toxicologie

Se cunoaşte de peste 40 de ani faptul că expunerea ocupațională la nichel provoacă apariția cancerului nazal sau pulmonar. Studiile epidemiologice din 1958 au arătat că muncitorii ce se ocupau cu rafinarea nichelului în Anglia au avut o creştere de 5 ori a riscului de cancer pulmonar şi de 150 de ori a cancerului nazal în comparație cu ceilalți oameni. Mai recent a fost raportată creşterea cazurilor de cancer pulmonar la muncitorii din diferite țări. Un număr de 6 cazuri de cancer renal au fost raportate printre muncitorii canadieni şi norvegieni.

Studiile experimentale pe animale au arătat că sulfura de nichel (Ni_3S_2) produce tumori locale şi in vitro, iar testarea celulelor mamare demonstrează că Ni_3S_2 şi $NiSO_4$ creşte transformarea celulelor mamare.

Otrăvirea cu nicheltetracarbonil

Nichelul metalic se combină cu monoxidul de carbon pentru a forma nicheltetracarbonil [$Ni(CO)_4$] care se descompune la nichel pur şi monoxid de carbon la încălzirea la 200^0 C. Această reacţie reprezintă o metodă eficientă de rafinare a nichelului. Cu toate acestea nicheltetracarbonilul este foarte toxic şi au fost raportate foarte multe cazuri de toxicitate acută. Boala începe cu durere de cap, stări de vomă, dureri în piept urmate de tuse, cianoză, simptome gastrointestinale. Simptomele pot fi însoţite de febră şi leucocitoză, iar cazurile mai severe progresează la pneumonie, cedarea aparatului respirator şi eventual edem cerebral şi moarte. Autopsiile arată că plămânii deţin cantitatea cea mai mare de nichel spre deosebire de rinichi, ficat sau creier.

Indicatori ai toxicităţii nichelului

Nivelele de nichel din sânge imediat după expunerea la carbonil de nichel oferă o informaţie în ceea ce priveşte severitatea expunerii şi o indicaţie asupra terapiei chelante. Dietilditiocarbamatul de sodiu este medicamentul preferat dar şi alţi agenţi chelanţi precum d-penicilamina şi trietilentetraamina oferă un grad de protecţie împotriva efectelor clinice.

Cobalt

Cobaltul este un component esenţial al vitaminei B_{12}, care este necesară pentru producerea celulelor roşii şi prevenirea anemiei. Există 0,0434 µg de cobalt pe microgram de vitamină B_{12}.

Cobaltul este un metal relativ rar şi se obţine ca un produs secundar la producerea altor metale, în primul rând a cuprului. Este folosit în aliaje pentru temperaturi înalte şi în magneţii permanenţi. Sărurile sale sunt folosite ca uscători pentru vopsele şi pentru producerea numeroşilor pigmenţi.

Sărurile de cobalt sunt în general foarte bine absorbite după ingestia orală, probabil în jejun. În ciuda acestui fapt nivelele crescute par să nu provoace o acumulare semnificativă. Aproape 80% din cobaltul ingerat este eliminat prin urină. Un procent de 15% din cobaltul rămas este excretat prin fecale pe o cale enterohepatică, în timp ce laptele şi transpiraţia sunt căi secundare de excreţie. Cantitatea totală de cobalt din organism a fost estimată la 1,1 mg.

Muşchii conţin cea mai mare fracţie totală, iar grăsimea conţine concentraţia cea mai mare. Ficatul, inima şi părul au concentraţii semnificative în comparaţie cu celelalte organe, dar ele sunt tot mici. Concentraţiile normale în urina umană şi sânge sunt de aproximativ 98 şi respectiv 0,18 µg/L.

Policitemia este răspunsul caracteristic majorităţii mamiferelor, incluzând oamenii, la ingerarea unei cantităţi excesive de cobalt. Toxicitatea rezultată din administrarea terapeutică excesivă produce vomă, diaree şi senzaţii de căldură. Administrarea intravenoasă conduce la înroşirea feţei, tensiune ridicată, respiraţie scăzută şi surzenie datorate efectelor dăunătoare asupra sistemului nervos.

Cardiomiopatia este cauzată de aportul excesiv de cobalt în special din consumul berii în care s-a adăugat 1 ppm de cobalt pentru a-i mări calitatea de spumare.

După injectarea şobolanilor cu cobalt s-a raportat o hiperglicemie provocată de daunele apărute la β celulele pancreatice. Reducerea presiunii sângelui a fost de asemenea observată la şobolani şi a condus la nişte utilizări experimentale la oameni.

Zincul

Zincul este un metal nutriţional esenţial iar deficienţa sa produce consecinţe severe în ceea ce priveşte sănătatea. Pe de altă parte, expunerea excesivă la zinc este relativ neobişnuită şi necesită expunere îndelungată. Zincul nu se acumulează la expunere continuă, dar conţinutul din corp este modificat de mecanisme homeostatice care acţionează în principal la absobţie şi nivelele ficatului. Zincul este omniprezent în mediu şi de aceea, este prezent în majoritatea alimentelor, în apă şi în aer. Conţinutul de zinc poate fi crescut în contact cu cuprul galvanizat sau ţevi de plastic. Fructele de mare, carnea, cerealele integrale, produsele lactate şi legumele au un conţinut ridicat de zinc. Zincul folosit pentru sol este preluat de legumele în creştere. Nivelele atmosferice de zinc sunt crescute deasupra zonelor industriale.

Toxicocinetică

Aproximativ 20-30 de procente din zincul ingerat este absorbit. Mecanismul pare a fi controlat homeostatic şi este probabil un proces purtător mediat. Este influenţat de prostaglandinele E_2 şi F_2 şi este chelatat de acidul picolinic un derivat de triptofan. Deficienţa de piridoxină şi triptofanreduce absorbţia zincului. În interiorul celulelor mucoaselor, zincul induce sinteza metalotioneinei şi, când este saturată, poate reduce absorbţia zincului. În sânge, aproape 2/3 din zinc este legat de albumină şi restul este complexat cu λ_2-macroglobulina. Zincul intră în tractul gastrointestinal ca un component al metalotioneinei secretată de către glandele salivare, mucoasa intestinală, pancreas şi ficat. Aproape 2 g de zinc sunt filtrate de rinichi în fiecare zi şi aproximativ 300 până la 600 µg/zi sunt excretate de un adult normal. Reabsorbţia renală tubulară este împiedicată de medicamentele uzuale prescrise precum diuretice şi este mai departe influenţată de proteinele din dietă.

Concentraţia zincului în ţesuturi variază. Ficatul primeşte până la 40% din doză eliminând până la 25% pe durata a 5 zile. Concentraţia zincului în ficat este influenţată de factorii umorali incluzând hormonul adrenocorticotropic, paratiroidal şi endotoxina. În ficat ca şi în alte ţesuturi, zincul este legat de metalotioneină. Cea mai mare concentraţie a zincului din corp este în prostată, probabil legat de conţinutul bogat în zinc a enzimei acid fosfatază.

Deficienţa

Mai mult de 70 de metaloenzime au nevoie de zinc drept cofactor, iar deficienţa conduce la un spectru larg de efecte clinice ce depind de vârstă, stadiul de dezvoltare şi deficienţele legate de alte metale.

Deficienţa în zinc la oameni a fost caracterizată pentru prima dată de Prasad şi colaboratori în 1963 la băieţii adolescenţi egipteni cu creştere deficitară şi maturizare sexuală întârziată. Acestea erau însoţite de malnutriţie protein-calorică, pelagră şi deficienţă de fier. Deficienţa de zinc la nou-născuţi se poate manifesta prin dermatită, pierderea părului, vindecare încetinită, susceptibilitate la infecţii şi anormalităţi neuropsihologice. Inadecvenţele dietare cuplate cu boli ale ficatului din alcoolismul cronic pot fi asociate cu dermatită, orbul găinilor, atrofie testiculară, impotenţă şi vindecare încetinită. Alte boli cronice clinice, precum colita ulcerativă, boală cronică renală şi anemia hemolitică. Multe medicamente afectează homeostază zincului în special agenţii chelanţi ai metalelor şi unele antibiotice, precum penicilina şi isoniazid. Deficienţele mai puţin comune ale zincului sunt artritele şi hipertensiunea.

Concentraţia normală a zincului din plasmă este de la 85 până la 110 μg/dl. Deficienţa severă poate conduce la scăderea nivelului zincului din plasmă până la 60 sau 40 μg/dl, însoţită de β_2-globulină şi scăderea α-globulinei. Excreţia zincului prin urină poate scădea de la 300 μg/zi la mai puţin de 100 μg/zi. Bineînţeles interacţiile zincului cu cadmiul şi plumbul pot modifica toxicitatea acestor metale.

Toxicitatea zincului

Toxicitatea zincului datorată ingerării excesive este neobişnuită, dar afecţiunea gastrointestinală şi diareea au fost raportate ca urmare a ingerării unor băuturi ce au stat în canistre galvanizate sau de la folosirea ustensilelor galvanizate. Cu toate acestea dovezi cu privire la toxicitatea hematologică, hepatică şi renală nu au fost observate la indivizi ce au ingerat până la 12 g de zinc elemental pe o perioadă de 2 zile.

Cu privire la expunerea industrială cel mai important efect este apariţia febrei la inhalarea fumului metalic. Tulburarea a fost în general asociată cu inhalarea fumului de oxid de de zinc, dar poate fi asociată şi cu inhalarea fumului altor metale, în special magneziu, fier şi cupru. Semnele apar de obicei după 4 sau 8 ore de la expunere, frisoane şi febră, transpiraţie şi slăbiciune şi durează numai 24 sau 48 de ore. Patogeneza nu este cunoscută. Extracte preparate din mucoasa traheală şi plămâni ale unor animale în care a fost introdus fumul metalic produce aceleaşi simptome atunci când este introdus în alte animale. Alte aspecte ale toxicităţii zincului nu au fost stabilite. Experimental li s-a administrat animalelor de 100 de ori mai mult necesarul dietar fără vreun efect vizibil.

Expunerea porcuşorilor de guineea 3 ore pe zi timp de 6 zile consecutive la 5 mg/m^3 oxidul de zinc ultrafin format a produs scăderea volumului din plămâni şi capacitatea difuziei monoxidului de carbon, efect ce a durat 72 de ore după expunere. Aceste schimbări funcţionale au fost corelate cu dovezi microscopice a îngroşării interstiţiale şi a infiltrării celulare în canalele alveolare.

Cadmiu

Cadmiul este un metal moale, ductil, alb-argintiu foarte toxic care este prezent în cantități mici în mediul înconjurător, incluzând alimentele, apa şi solul şi în majoritatea substraturilor biologice deşi nu are nici un rol biologic cunoscut. Din acestea căile primare de expunere sunt prin alimentație şi contact dermal după expunere ocupațională susținută.

Solul se contaminează prin depunerea particulelor de cadmiu din atmosferă. Cadmiul din sol poate fi clasificat în 3 categorii distincte în ceea ce privesc efectele asupra sănătății omului. Acestea cuprind solurile neagricole, solurile agricole şi căderile de pământ controlate. Cadmiul din căderile de pământ controlate este practic imobil şi este puțin probabil să aibă vreun efect asupra sănătății omului sau a mediului. Cadmiul din solurile neagricole nu va afecta sănătatea omului deoarece nu intră direct în lanțul trofic, sau poate să ajungă indirect prin transferul spre terenurile agricole via transportul prin apă sau prin aer. În solurile agricole, cadmiul este, de asemenea, relativ imobil în condiții normale, dar poate deveni mai mobil în anumite condiții de creştere a acidității solului sau de creştere a concentrației prin utilizarea de îngrăşăminte chimice, naturale sau a nămolurilor. Factorii principali care inflențează speciația, adsorbția şi distribuția cadmiului în sol sunt pH-ul, conținutul de materie organică, conținutul de oxid metalic hidratat.

Datorită presiunii sale de vapori relativ scăzute şi a volatilității termice mari şi în special datorită eliberării de săruri de cadmiu acvosolubile în apa reziduală industrială, concentrațiile de cadmiu din mediul înconjurător sunt în continuă creştere şi prezintă un risc considerabil pentru sănătatea publică. Metalul se găseşte în concentrații mai mari în anumite plante de exemplu în frunzele de tutun şi se acumulează țesutul moale al animalelor, ajungând la nivele potențial toxice. Aportul alimentar şi fumatul sunt astfel principalele surse ale expunerii umane la cadmiu. Faptul că din populația generală, fumătorii sunt în special în pericol a fost demonstrat prin nivele semnificativ de ridicate de cadmiu măsurate în sânge şi fluide seminale în comparație cu valorile corespondente găsite la nefumători. O țigară conține între 0,5-2 µg Cd aproximativ 10% din conținut fiind inhalat atunci când se fumează o țigară.

Toxicitatea cadmiului

DL_{50} după injectarea unui compus solubil al cadmiului este între 2,5-25 mg/kg. DL_{50} orală este de 10-20 de ori mai mare decât cea prin administrare parenterală. Doza letală estimată este între 350-8900 mg, corespunzătoare la doze între 20-130 mg/kg pentru un adult de 70 kg.

Toxicocinetica

Absorbția pe cale respiratorie. Expunerea pe această cale se realizează prin inhalarea particulelor de cadmiu. Proporția de cadmiu absorbit este influențată de mărimea particulelor, de solubilitatea şi forma chimică a acestuia. Din totalul inhalat, se estimează că se absoarbe 10-50%, iar din acesta până la 90% în partea inferioară a plămânului.

Absorția pe cale orală. Cadmiul ingerat este slab absorbit şi totodată absorbit în proporții diferite dependent de speciația acestuia, specia de animal, doza şi frecvența administrării, statusul nutrițional şi interacțiunile cu diverşi nutrienți. Absorbția acestui metal

creşte în cazul deficienței de fier şi calciu şi scade în prezența zincului şi creşte şi cu coadministrarea de cupru.

Cadmiul legat de metalotioneine în alimente este absorbit de şoareci în proporție mai mică decât sub formă ionică. Totodată absorbția este mai accentuată la tineri şi mai mare la femele decât la masculi.

Distribuția. Cadmiul nu suferă conversii metabolice, dar ionul de cadmiu se poate lega la grupări anionice, în special grupări sulfhidril, în proteine şi alte molecule.

După absorbție, cadmiul este transportat de sânge, fixat pe eritrocite sau legat de proteine cu masă moleculară mare. Cadmiul este preluat de celulele hepatice unde se leagă la metalotioneine. Legat astfel în ficat, el este eliberat lent în plasmă. Datorită dimensiunilor mici ale complexului cadmiu-metalotioneină, acesta trece liber prin glomer în tubulul renal. Cadmiul legat de metalotioneină este preluat eficient în tubul proximal prin pinocitoză. În celulele tubulare renale, vacuolele pinocitare sunt lizate de lizozomi, care degradează metalotioneina, eliberând astfel cadmiul. Metalul se combină apoi cu nou-sintetizatele metalotioneine produse de celulele tubulare şi se acumulează în rinichi pentru zeci de ani. Studiile au arătat că expunerea la nivele scăzute de cadmiu induce producerea de metalotioneine, permițând depozitarea în proporție mai mare în ficat şi rinichi, reducând astfel toxicitatea acută a metalului.

Eliminarea. Mare parte din cadmiul ingerat este eliminat nemodificat prin fecale, iar cel absorbit este eliminat din organism mai ales prin urină, dar şi prin bilă,salivă şi transpirație. Proporția de cadmiu eliminată zilnic prin urină este totuşi foarte mică, reprezentând doar 0,005-0,01% din totalul din corp. La subiecții expuşi profesional la cadmiu excreția urinară este de 2μg/g creatinină.

Efectele patogene

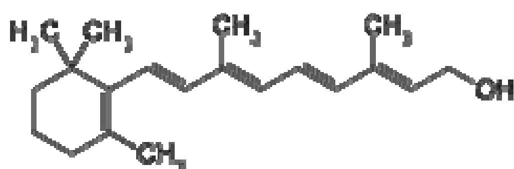
Simptomele clinice ale toxicității cadmiului includ, în general, manifestări hepatice şi renale, anemie, piele solzoasă. Există dovezi şi în ceea ce priveşte interferența cadmiului în formarea oaselor creşterea resorbției osoase in vivo şi scăderea acumulării osteoblastice a calciului in vitro.

Metalul a fost asociat şi cu neoplasm malign la oameni, iar carcenogenitatea indusă de cadmiu poate fi în principal datorată deteriorării oxidative a ADN-ului.

Principalele efecte constatate ca urmare a expunerii omului la cadmiu sunt următoarele:

- *Efecte renale***.** Numeroase studii au arătat că rinichii sunt principala țintă a toxicității cadmiului. Metalul lezează atât glomerulul, cât şi tubulul renal proximal. Leziunile glomerulare sunt caracterizate prin pierderi ale proteinelor mari prin urină, aminoacidourie, glucozurie şi hipercalciurie.

Efectele adverse asupra tubulului proximal sunt caracterizate prin creşteri ale nivelurilor urinare a numeroase proteine tubulare. Proteinele tubulare sunt proteine mici, care se găsesc în plasmă şi care nu sunt filtrate de glomerul, trecând astfel în tubulul renal. Creşterea concentrațiilor urinare ale proteinelor tubulare, cum sunt microglobulina β_2, microglobulina α_1, proteina legată de retinol şi N-acetil-β-glucoza-minidaza indică leziuni ale tubului proximal.

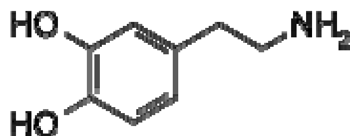


Retinol

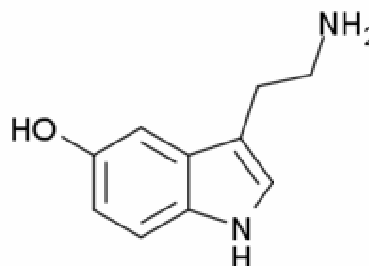
În afară de nivelurile crescute ale unor proteine urinare, nivelurile crescute de cadmiu pot fi, de asemenea, consecință a leziunilor renale. Atunci când efectele tubulare nu sunt evidente, sunt observate creşteri ale concentrațiilor de cadmiu în urină, o dată cu vârsta. În jurul vârstei de 50 de ani, concentrația acestui metal în rinichi atinge maximul, după care începe să scadă. Scăderea se poate datora răspunsului funcției tubulare alterate cu vârsta. Disfuncția renală asociată cu expunerea ridicată la cadmiu se reflectă, de asemenea, prin reducerea nivelului cadmiului în rinichi şi concentrații ridicate ale acestuia în urină. În ambele circumstanțe, abilitatea rinichilor de a depozita cadmiul poate fi compromisă.

La muncitorii expuşi la cadmiu, în special cei care prezintă proteinurie, s-a constatat incidență crescută de pietre la rinichi. Acest efect poate fi secundar creşterii excreției de calciu, atunci când sunt prezente leziuni tubulare substanțiale.

- *Efecte neurotoxice.* Cadmiul este cunoscut că alterează concentrația neurotransmițătorilor din creier şi poate inhiba intrarea calciului în neuroni. Efectele neurologice constau în activitate motorie redusă, slăbiciune şi atrofie musculară, comportament agresivşi alterări ale nivelurilor dopaminei, 5-hidroxitriptaminei, dehidrogenazei succinice şi monoaminooxidazei din creier . Expunerea cronică poate conduce la neuropatii periferice.



Dopamina



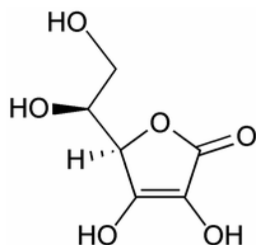
5-hidroxitriptamina

- *Efecte cardiovasculare şi hematologice.* Un număr de studii pe oameni şi animale au găsit o corelație între ingestia de cadmiu şi presiunea sanguină crescută, dar alte studii nu au găsit nici o asociere semnificativă. S-a concluzionat că dovezile de toxicitate cardiovasculară rezultate în urma expunerii orale sunt neconcludente la om, iar intensitatea oricărui efect al cadmiului asupra presiunii sangvine este mică în comparație cu alți determinanți ai hipertensiunii. Creşteri ale tensiunii alteriale au fost observate la animale expuse la doze de 0,008-1,6 mg Cd/kg/zi şi 0,01-1,7 mg Cd/kg/zi după o expunere intermediară, respectiv cronică.

Mecanismele prin care cadmiul afectează presiunea sangvină au fost studiate de Perry şi Koop (1983). La doze care produc hipertensiune a fost detectată activitatea crescută a reninei

circulatorii şi, atât expunerea parenterală cât şi cea orală cronică, a determinat creşterea reținerii de sodiu.

Expunerea orală reduce absorbția gastrointestinală a fierului, ceea ce poate conduce la anemie dacă aportul de fier prin rație este redus. În studiile pe animale, s-a constatat că suplimentarea rațiilor cu fier sau acid ascorbic poate preveni anemia.



Acid ascorbic

Administrarea parenterală a cadmiului produce distrugerea eritrocitelor, dar nu sunt indicații asupra faptului că ar afecta sinteza de hemoglobină.

- *Efecte asupra gonadelor, reproductive şi de dezvoltare*. În urma expunerilor acute şi subacute la cadmiu au fost observate efecte testiculare, constând în necroză şi atrofii ale epiteliului tubulilor seminiferi, greutate crescută a testiculelor şi scăderea numărului şi motilității spermatozoizilor (castrare chimică). Aceste efecte apar la doze de 5,8 mg Cd/kg/zi şi mai mari. Efectele testiculare ale cadmiului pot fi datorate interferenței acestuia cu complexele zinc-proteine, care controlează transcripția ADN, ducând ulterior la apoptoză. Doze similare la femei induc hemoragii şi necroze ovariene.

Cele mai frecvente efecte ale expunerii la acest metal sunt reducerea greutății fetale sau a nou-născutului la naştere şi alterări ale comportamentului locomotor. În timp ce cadmiul a produs şi toxicitate maternă, efectele asupra produşilor de concepție nu par neapărat a fi datorate acesteia.

- *Efecte mutagene şi teratogene.* Genotoxicitatea cadmiului a fost studiată atât la oameni, cât şi la animale şi in vitro. În timp ce genotoxicitatea a fost observată în unele studii pe oameni expuşi la cadmiu şi în unele teste in vitro, concluziile sunt confuze şi contradictorii. Studiile de genotoxicitate nu asigură dovezi complete că efectele genotoxice se datorează mai ales acțiunii cadmiului; genotoxicitatea pare să fie doar unul dintre mecanismele de acțiune care contribuie la toxicitatea cadmiului.

Teratogenitatea cadmiului a fost trecută în revistă de Ferm şi Layton, 1981 şi Ferm şi Hanlon, 1983. S-a constatat că folosirea produşilor de concepție cu doze mici de cadmiu protejează împotriva unor doze ulterioare de cadmiu, la un nivel la care ar fi probabil teratogen, probabil prin inducerea sintezei de metalotioneine. Protecția este asigurată de co-administrarea zincului sau seleniului. Deficiența maternă în zinc, singură, poate produce malformații congenitale, iar administrarea de cadmiu animalelor zinc deficiente ar creşte incidența malformațiilor.

- *Efecte asupra imunității.* S-a observat că efectele imunologice induse de cadmiu sunt diverse în studiile pe animale, în unele cazuri constatându-se supresie, iar în altele stimularea răspunsului imun. Cadmiul s-a observat că supresează imunitatea umorală şi este

citotoxic pentru limfocitele splenice. De asemenea, cadmiul a determinat mortalitate crescută în leucemiile induse viral, sugerând că imunosupresarea este un posibil mecanism de acțiune în ceea ce privesc efectele tumorigene ale acestuia. Pe de altă parte, administrarea cadmiului a determinat rezistență crescută la infecțiile virale şi imunitate mediată-celular crescută.

- *Efecte cancerigene.* Studiile epidemiologice ale acțiunii cancerigene ale cadmiului au fost realizate mai ales în cazurile de expunere prin inhalare la locul de muncă, costatându-se creşterea procentului de cancer pulmonar şi de prostată printre astfel de muncitori.

IARC (International Agency for Research on Cancer) a clasificat cadmiul în grupa 1 carcinogenă- cunoscut carcinogen uman, iar EPA (Environmental Protection Agency) l-a clasificat ca probabil carcinogen prin inhalare, pe baza datelor obținute pe oameni şi animale.

- *Efecte asupra metabolismului calciului şi oaselor.* Cel mai cunoscut eveniment cu privire la toxicitatea cadmiului asupra omului este probabil boala itai-itai. Într-un district al Japoniei după cel de-al doilea război mondial şi până pe la începutul anilor 1970, s-a descoperit că mulți oameni sufereau din cauza unei boli care provoca durere şi suferință şi chiar şi moarte. S-a descoperit a fi rezultatul poluării apei râurilor cu reziduri conținând Cd ce proveneau din activitățile de minerit. Apele poluate au fost folosite pentru irigare terenurilor cu plantații de orez, rezultând orez contaminat cu Cd. Consumatorii, în special femeile sufereau din cauza decalcifierii scheletului, boala itai-itai fiind caracterizată prin producerea unor fracturi multiple şi distorsiuni ale oaselor scheletice lungi, dureri mari şi leziuni renale. Câteva mecanisme toxice pot contribui la boala itai-itai, incluzând disrupții în metabolismul vitaminei D, eliminare crescută a calciului prin urină şi interferențe cu metabolismul calciului şi fosfatului. Este interesant de menționat că efectele scheletice nu sunt observate la muncitorii cu proteinurie datorată expunerii la cadmiu. Alte studii vaste în Europa au legat expunerea la cadmiu cu excreția urinară crescută de calciu şi activitate serică crescută a fosfatazei alcaline la femei şi la bărbați. Prin distrugerea dentinei se ajunge la carii dentare.

Expertiza produselor alimentare

În cazul sacrificărilor de necesitate se confiscă organele interne, capul, mamela şi se dirijează spre prelucrare tehnică. Carnea se supune examenului toxicologic de laborator în vederea stabilirii conținutului de cadmiu. Carcasele la care sunt depăşite limitele maxim admise se confiscă. Sacrificarea animalelor remise este permisă numai după 15 săptămâni. Sângele animalelor sacrificate se confiscă şi se denaturează. Glandele endocrine nu se vor folosi în industria farmaceutică sau în alt scop tehnic. Laptele se dă în consum numai după control toxicologic de laborator. Peştii, moluştele şi crustaceele se vor supune şi ei examenului toxicologic de laborator, în special dacă provin din ape care conțin cadmiu, chiar în cantități mici, ştiut fiind că acesta se acumulează în organismele acvatice.

Din produsele de origine vegetală s-a încercat îndepărtarea metalului prin spălare cu apă, caz în care se îndepărtează doar dacă metalul este depus pe suprafață sub formă de pulberi. Din uleiul vegetal, Ivanov şi colaboratorii au încercat să aplice diverse metode pentru a demetaliza produsele. S-a constatat că, o dată cu creşterea gradului de esterificare a poliuronidelor utilizate, eficiența demetalizării scade. Prin tratarea uleiurilor cu acid pectinic, gradul demetalizării a fost şi mai mare. Prin tratarea uleiurilor cu soluții apoase de acid pectinic,

s-a constatat că gradul de îndepărtare a ionilor metalici crește o dată cu scăderea concentrației acizilor pectinici în soluția apoasă.

Din sursa de apă, cadmiul poate fi îndepărtat eficient prin tratare cu var şi coagulare cu sulfat feric, prin acest proces fiind îndepărtat peste 90% din concentrația inițială de cadmiu.

Limite maxime admise

Pentru aer se acceptă maximum 5 ng Cd/m^3.

OSHA (Occupational Safety and Health Administration) limitează concentrația cadmiului în aerul de la locul de muncă la 100 µg/m^3 sub formă de fum sau vapori şi 200 µg/m^3 sub formă de pulberi. FDA (Food and Drug Administration) limitează proporția de cadmiu din coloranții alimentari la 15 ppm.

Pentru apa de băut EPA a limitat cantitatea la 5 µg/l. Conținutul maxim admis de cadmiu din furajele de origine nimală sau vegetală este între 1-2 mg/kg la o umiditate de 12%. Nivelele admise de cadmiu sunt prezentate în tabelul 4

Tabel 4. Nivele admise de cadmiu în alimente

PRODUSUL	Limita maximă admisă (mg/kg)
Carne de bovine, ovine, porcine şi carne de pasăre	0,05
Carne de cal	0,2
Ficat de bovine, ovine, porcine şi de pasăre	0,5
Rinichi de bovine, ovine, porcine şi de pasăre	1,0
Peşte	0,05
Peşte marin	0,1
Crustacee	0,5
Moluşte bivalve	1,0
Cefalopode	1,0
Cereale cu excepția grâului, orezului	0,1
Tărâțe, germeni, făină	0,05
Soia	0,2
Legume şi fructe cu excepția produselor frunzoase	0,1
Produse frunzoase, ierburi proaspete	0,2
Legume cu tijă, rădăcinoase şi cartofi	0,1

Cromul

Cromul este un metal dur, lucios şi rezistent la coroziune ce a fost descoperit în 1797 în Franța de Nicolas-Louis Vauquelin. Acesta este abundent în scoarța terestră şi apare în stări de oxidare de la Cr^{2+} până la Cr^{6+}, dar numai formele trivalente şi hexavalente prezintă importanță biologică. Principala sursă de crom provine din minereul de crom. Cromitul metalurgic este de obicei transformat în aliaj ferocromic sau alte aliaje pe bază de crom ce conțin cobalt sau nichel. Sărurile de crom se folosesc pentru obținerea de pigmenți sau ca anticorozive în diferite sisteme.

Cromul din aer provine din surse industriale, în special din producția aliajului ferocromic, rafinarea mineurului şi din procese chimice. În zonele rurale, cromul se găseşte de obicei în aer în concentrații mai mici de 0,1 ng/m^3 şi în concentrații de la 0,01 la 0,03 $\mu g/m^3$ în oraşele industriale. Particule din fabrici bazate pe arderea cărbunilor pot conține de la 2,3 până la 31 ppm. O altă sursă importantă de crom atmosferic o reprezintă fabricile producătoare de ciment. Cromul precipită şi se depune pe câmpuri sau în ape. Cromul în alimente se găseşte într-o concentrație foarte mică iar aportul zilnic de Cr se estimează a fi mai mic de 100 μg. Prezența cromului în alimente se poate datora contaminării în diversele etape ale producției.

Cromul trivalent este forma cea mai întâlnită formă a cromului din natură. Nu există dovezi cum că cromul trivalent s-ar transforma în crom hexavalent în sistemele biologice. Totuşi cromul hexavalent trece uşor prin menbranele celulelor şi este redus intracelulr la crom trivalent. Cr^{3+} joacă un rol important în metabolismul zahărului şi funcționează prin intermediul insulinei menținând toleranța normală pentru glucoză. În prezența unei cantități optime de crom activ biologic este nevoie de mai puțină insulină. Cromul este absorbit de organism în proporție de 0,5%. Cromul hexavalent este mult mai toxic şi poate da naştere, de exemplu, la alergii sau eczeme de contact şi poate fi de asemenea şi carcinogen.

Concentrații mari de crom se găsesc de obicei în ARN dar rolul său este necunoscut. Cantități sub formă de urme de Cr^{3+} sunt esențiale pentru metabolismul carbohidraților la mamifere. Are de asemenea un rol în activitățile periferice ale insulinei prin formarea unui complex ternar cu receptorii insulinei, facilitând ataşarea insulinei de aceste situsuri.

Deficiența de crom la oameni poate apărea la copiii ce suferă de malnutriție protein-calorică şi la persoanele în vârstă cu toleranța pentru glucoză afectată, dar acest lucru nu este foarte bine documentat. Consumarea prelungită a unei diete sintetice fără suplimentare cu crom poate conduce la afectarea metabolismului glucozei şi posibile efecte asupra creşterii şi asupra metabolismului lipidelor şi a proteinelor.

Toxicitatea cromului

Intoxicarea cu crom are loc de obicei datorită expunerii accidentale şi încercărilor ocazionale de a folosi cromul pe post de agent pentru sinucideri. Efectul acut major al cromului ingerat este necroza renală tubulară acută.

Expunerea la cromul folosit în industria pigmenților de exemplu, poate produce cancer la nivelul tractului respirator. La începutul anilor 1936 autoritățile germane ce se ocupau cu sănătatea publică au găsit cancer pulmonar printre muncitorii expuşi la praful de crom. Cel mai mare risc de cancer este atribuit expunerii la cromul hexavalent solubil în acizi şi insolubil în apă ce apare în procesele de coacere şi rafinare. Cromul hexavalent este coroziv şi produce ulcerații

cronice şi perforații ale septului nazal. Provoacă de asemenea ulcerații cronice şi aupra altor suprafețe ale pielii, ceea ce este independentă de reacțiile de hipersensibilitate ale pielii. Reacții alergice ale pielii datorate cromului au loc foarte uşor şi sunt independente de doză. Deşi compuşii cromului covalent sunt considerabil mai puțini toxici şi nu sunt nici iritanți, nici corozivi, muncitorii din industrie sunt expuşi la ambele forme. Nu este clar încă dacă cromul provoacă şi în alte zone cancer decât la nivelul tractului respirator.

Studiile pe animale sprijină faptul că cei mai posibili carcinogeni sunt compuşii cromului hexavalent puțin solubili. În schimb studiile in vitro pe sisteme bacteriene nu arată că ar fi vreo diferență între compuşii solubili şi cei mai puțin solubili. Sărurile cromului trivalent nu au sau au foarte puțină activitate mutagenică asupra sistemelor bacteriale. Din moment ce este preferată absorbția cromului hexavalent de către celule iar forma trivalentă este cea metabolic activă şi se leagă cu acizii nucleici în interiorul celulei, s-a sugerat că agentul cauzal în mutageneza cromului este cromul trivalent legat de materialul genetic după reducerea formei sale hexavalente.



$$Cr_2O_7^{2-} + H_2O \rightleftharpoons 2HCrO_4^- \rightleftharpoons 2H^+ + 2CrO_4^{2-}$$



$$CrO_4^{2-} + 8H^+ + 3e^- \rightarrow Cr^{3+} + 4H_2O$$

Concentrațiile de crom din țesut la populația generală prezintă variații geografice considerabile, ce ajung până la 7 µg/kg în plămânii persoanelor din New York sau Chicago cu concentrații mai mici în rinchi şi ficat. La persoanele fără expunere excesivă, concentrația Cr din sânge este între 20 şi 30 µg/l şi este distribuită în egală măsură între eritrocite şi plasmă. În cazul expunerii ocupaționale, creşterea cromului din sânge este legat de creşterea cromului din celulele roşii. Excreția urinară este în general mai mică de 10 µg/zi în absența expunerii excesive.

Tabel 5. Aportul mediu zilnic de crom (mg) din dietă în anumite țări

	Adulți	Femei	Bărbați
SUA		0,012	0,019
Austria		0,031	0,038
Belgia 1992	0,053		
Suedia 1988		0,020	
Marea Britanie 1994	0,30		
Marea Britanie 1997	0,10		

Cuprul

Cuprul se găseşte în natură sub formă de minereuri, mai frecvent sub formă de cuprit (Cu_2O) şi malahit ($Cu_2CO_3(OH)_2$). Principalele minereuri sunt sub formă de sulfiți, oxizi şi carbonați.

Cuprul a fost cunoscut, minerit şi utilizat de oameni din cele mai vechi timpuri, fiind probabil al doilea, după fier, în ceea ce priveşte utilitatea lui pentru oameni. Se utilizează intens pentru fabricarea țevilor pentru apă, în special pentru uz casnic. Cuprul este utilizat şi în producerea cablurilor electrice şi a aliajelor cum sunt alama şi bronzul. Este de asemenea

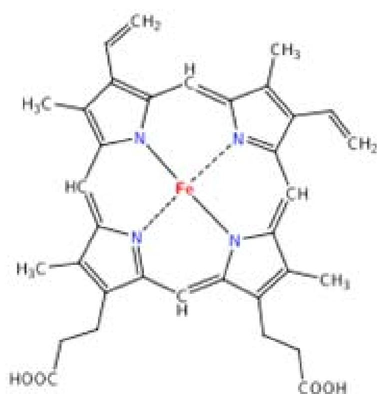
utilizat în galvanizare la fotografii, acoperişuri, catalizator în industria chimică şi pentru îndepărtarea mercaptanilor şi rafinarea petrolului. Cuprul este utilzat intens şi în diverse formulări de pesticide. De exemplu, sulfatul de cupru este utilizat ca fungicid şi bactericid pentru prevenirea bolilor la fructe, legume şi culturile cerealiere şi ca ierbicid, muloscocid şi pentru controlul dezvoltării creveților în orezării.

După absorbția în fungi sau bacterii, ionii de cupru se vor lega la diferite grupe chimice (imidazol, fosfat, hidroxil) prezente în numeroase proteine şi vor tulbura funcționarea acestora. Ionul toxic de cupru este absorbit de sporul germinativ al fungului, astfel că, pentru a obține rezultate optime, cuprul trebuie reaplicat pe măsură ce plantele cresc, pentru a menține protecția şi pentru a preveni apariția bolilor. Este utilizat şi pentru conservarea lemnului şi pentru tratarea apei de băut şi a celei din bazine.

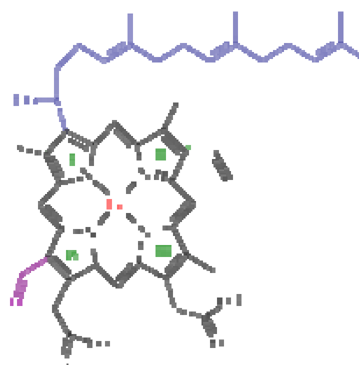
În sol cuprul se găseşte în jur de 70 ppm, iar în apa de mare între 0,001-0,02 ppm. În apa de băut, concentrația cuprului este variabilă, cu medii între 60-150 μg/l, concentrații care cresc în special în cazul apei cu pH scăzut şi duritate mică şi care ajunge la consumator prin țevile de cupru. Acestea însă nu sunt singurele variabile care influențează dizolvarea cuprului în apă – potasiul, sodiul, hidrogenul, sulfatul, oxigenul dizolvat, clorul, nitratul şi conductivitatea apei influențând gradul de solvire al cuprului în apă. Deoarece perioada de timp cât stă apa în conducte este de asemenea importantă, cele mai relevante date privind aportul de cupru prin apă sunt furnizate de concentrația cuprului în apa consumată.

Cuprul este disponibil şi în majoritatea alimentelor naturale. Unii specialişti afirmă chiar că aportul mediu este mai ridicat decât nevoile zilnice şi că toxicitatea acestuia a devenit chiar o problemă. Alimente cu conținut ridicat de cupru sunt cerealele, în special grâul şi hrişca, creveții şi fructele de mare, ficatul şi alte organe interne, fasolea şi mazărea uscată, nucile, alunele, soia, fructele uscate, cacaoa, piperul negru şi drojdia. Stridiile conțin cantități mari de Cu, de aproximativ cinci ori mai mult decât alte alimente. În alimentele procesate sau păstrate în vase cu aliaje din cupru, concentrația acestuia este mare, cuprul fiind solvit, în special în alimentele acide.

Cuprul este esențial în alimentația mamiferelor, fiind necesar în numeroase reacții enzimatice. Este esențial în pentru utilizarea normală a fierului, datorită necesității feroxidazei (ceruloplasminei) pentru transportul fierului. Deficiența cuprului (sub 2 mg/zi) duce la anemie, rezultată prin incapacitatea reticulocitelor de a obține fier de la transferine şi de a sintetiza hemul din fier şi protoporfirine la o rată normală. Clinic se traduce prin anemie hipocromă, microcitară, refractară la fier şi prin susceptibilitate la infecții. Deficiența este uneori însoțită de anomalii osoase.



Hem B



Hem A

Alte sisteme enzimatice care necesită cupru includ monoaminooxidazele, necesare pentru pigmentare, controlul neurotransmițătorilor şi a neuropeptidelor; liziloxidaza, esențială pentru menținerea țesuturilor de legătură din pulmoni, oase şi a elastinei din sistemul cardiovascular, citocrom c oxidaza, implicată în metabolismul oxidativ, funcționarea creierului, sinteza hemului şi a fosfolipidelor şi superoxid dismutaza, necesară pentru distrugerea radicalilor superoxid.

Există şi câteva boli genetice care afectează utilizarea cuprului, acestea fiind sindromul Menke, boala Wilson şi aceruloplasminemia. Anomaliile genetice asociate primelor două boli au fost identificate a fi defecte ale ATP-azelor de tip P. Aceruloplasminemia este o tulburare autosomală recesivă determinată de modificările în gena ceruloplasminei, care afectează abilitatea ceruloplasminei de a lega cuprul.

Ca urmare, în sindromul Menke, absorbția intestinală a cuprului este foarte scăzută, ceea ce duce la acumularea acesteia în mucoasa intestinală şi, adesea, la moarte. În sindromul Wilson tulburările de metabolizare a cuprului conduc la concentrații mici de cupru în ser şi în păr, dar nivele ridicate în ficat şi creier.

Toxicitatea cuprului

Toxicitatea cuprului este dependentă de specie, tipul de compus, calea de pătrundere în organism şi raportul cu alte microelemente din rație. Cei mai toxici compuşi sunt sărurile mai solubile. DL_{50} pentru şobolani sunt între 30 şi 472 mg/kg. Răspunsuri toxice la oameni au fost observate la doze de 11 mg/kg. Ingestia sulfatului de cupru este adesea netoxică, deoarece se declanşează automat voma, ca urmare a efectului iritant asupra tractului gastrointestinal. Moartea se poate produce la ingestia a câtorva grame de sulfat de cupru.

Toxicocinetica

Căile de pătrundere a cuprului în organism sunt calea orală, cu apa şi alimentele contaminate în urma tratamentelor la care au fost supuse sau ca urmare a păstrrii în vase de cupru, calea respiratorie şi dermică, în special în special în cazul muncitorilor expuşi profesional.

După pătrunderea pe cale, cea mai mare parte a cuprului este absorbit la nivelul stomacului şi duodenului. Concentrația maximă a cuprului în sânge a fost observată în intervalul 1-3 ore după ingestie. Eficiența absorbției este între 15-97%. Absorbția cuprului se realizează atât prin mecanisme active, cât şi pasive. La aport scăzut şi moderat de cupru, acesta este absorbit prin mecanisme de transport active saturabile, iar la aport ridicat este absorbit prin difuzie pasivă.

Factorii care pot interfera cu absorbția cuprului includ competiția pentru situsurile de legare cu zincul, interacțiunile cu molibdenul, manganul şi sulfații, chelatarea cu fitații şi inhibarea cu acidul ascorbic.

Cuprul absorbit din tractul gastrointestinal este transportat rapid în sânge şi depozitat în ficat, legat de metalotioneine, din care este eliberat şi încorporat în ceruloplasmine, un transportor specific pentru cupru. Cu^{2+} care rămâne în sânge este legat la albumine sau aminoacizi sau la eritrocite. Aproximativ 80% din cuprul absorbit este legat de metalotioneinele din ficat, iar restul este încorporat în citocrom c oxidaza sau este sechestrat de către lizozomi.

Cuprul, sub formă de Cu^{2+}, atunci când intră în hepatocite este inițial redus şi complexat de către glutation înainte de legarea la metalotioneine. Alternativ, cuprul care intră în celule poate fi exportat de către cupru-ATP-translocaza.

Distribuția cuprului este influențată de sex, vârstă şi de nivelul său din rație. Creierul şi ficatul prezintă concentrația cea mai mare (aproximativ o treime din cantitatea totală din organism), concentrații mai mici fiind găsite în inimă, splină, rinichi şi sânge.

Nivelul cuprului din eritrocite este foarte stabil, în timp ce concentrațiile plasmatice prezintă fluctuații mari, în legătură cu sinteza şi eliberarea ceruplasmei. Nivelul plasmatic al cuprului în timpul sarcinii poate fi de două ori mai mare decât înainte, datorită sintezei crescute de ceruloplasmine. Sursa cuprului suplimentar este ficatul. Estrogenii par a fi agenții stimulatori de eliberare a cuprului din ficat.

Principala cale de eliminare a cuprului este calea biliară şi apoi fecalele. Alte căi minore sunt saliva, transpirația şi laptele. Timpul de înjumătățire a cuprului în organism este foarte scurt, astfel încât acesta nu are tendința de acumulare.

Efectele patogene şi simptomatologia

Intoxicația acută cu cupru este rară la mamiferele superioare, având în vedere acțiunea emetizantă puternică a acestuia. La oameni, toxicitatea acută este de obicei corelată cu ingestia accidentală; simptomele includ gust metalic în gură, greață, vomă, durere epigastrică, diaree, icter.

În cazuri grave, fecalele şi saliva sunt verzi-albastre. În fazele terminale, anemia, hipotensiunea şi coma preced moartea.

Indivizii cu deficiență de glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza pot prezenta risc crescut în ceea ce priveşte efectele hematologice ale cuprului.

Efectele gastrointestinale ale cuprului au fost investigate în mai multe studii, care au pus în evidență o corelație între concentrația cuprului şi incidența simptomelor

gastrointestinale, în timp ce alți indicatori ai homeostaziei cuprului, cum sunt nivelurile serice şi cele ceruloplasminice şi statutul ficatului nu s-au modificat semnificativ.

Riscul de aport prin rație de peste 5 mg Cu/zi pare să fie mic. Se ştie doar că viticultorii care aplică sulfat de cupru dezvoltă boli de ficat după 3-15 ani de expunere la astfel de soluții, indivizii mai expuşi, în afară de cei cu deficit de glucuzo-6-fosfat-dehidrogenază, fiind cei cu boala Wilson, care duce la absorție şi depozitare excesivă de cupru.

Variații mari au fost raportate în ceea ce priveşte susceptibilitatea la cupru a diferitelor specii de animale, cele mai sensibile fiind oile, iar cei mai puțin sensibili fiind şobolanii.

EPE a clasificat cuprul în grupa D-neclasificabil ca şi carcinogen uman; nu produce genotoxicitate, iar studiile efectuate în ceea ce privesc efectele reproductive şi de dezvoltare nu au evidențiat vreo corelație între prezența cuprului şi astfel de efecte. La doze mari s-a constatat moarte fetală şi număr mic de nou născuți la şoarece.

Tratamentul cu chelatori

Tratamentului de chelare implică utilizarea de compuşi chimici injectat în fluxul de sânge, musculare sau luate de gura pentru a lega metale, care sunt prezente în concentrații toxice astfel încât să poată fi eliminată (de obicei în urină) din organism.

Care sunt utilizările legitime pentru tratament chelator?

Tratamentului de chelare este indicată medical atunci când niveluri toxice de metale grele, cum ar fi de fier, arsenic, plumb, mercur şi sunt prezente. În timp ce fierul este un metal vital alte metale (arsenic, plumb, mercur şi) nu sunt cerute de organism.

- Toxicitatea plumbului apare cel mai frecvent cu copii mai mici expusi la case vechi cu praf vopsea cu plumb sau chips-uri. Expunerea profesională (sudori de lipit,, topitorii, baterie regenerare) este, de asemenea, un risc. Screening-ul de plumb pentru copii a devenit acum o parte standard a vizita un medic pentru copii în statele membre pot.
- Mercur toxicitate apare aproape întotdeauna cu expunerile la risc ridicat de muncă, inclusiv lucrătorilor dentare, producatori de baterii / termometre, lucru tăbăcărie / taxidermie, şi fructe de mare contaminate.
- ntoxicația cu arsen apare, de obicei de la expunerea la insecticide, erbicide, otrăvuri rozătoare, medicamente veterinare parazitare, sau otrăvire intenționată.

Alte metale grele, menționată doar în trecere, deoarece expunerea la substante toxice este extrem de puțin frecvente, includ: cadmiu, aluminiu mangan, cobalt, zinc, nichel, cupru şi magneziu.

Toxicitatea metalelor grele poate provoca o gamă largă de probleme, inclusiv leziuni grave la organele corpului şi a creierului.

Agenți de chelare:

• mesilat Desfuroxamine: utilizate pentru toxicitate de fier, pe cale intravenoasă preferată de administrare.

• Dimercaprol (BAL): agent de plumb, arsenic şi preferat pentru toxicitate mercur, administrat intramuscular

- DMSA: un analog de Dimercaprol care poate fi administrat oral timp de intoxicare cu plumb şi arsenic

  • D-penicilamina: o cale orala Chelatori utilizate pentru plumb, arsenic, mercur sau otravire. Mult mai puțin costisitoare, dar nu la fel de eficient ca DMSA.

  • calciu disodiu Versante (CaNa2-EDTA): pot fi folosite în conjuncție cu BAL în toxicitate plumb. Nu a folosit niciodată singur în tratarea toxicitate chelați de plumb, deoarece numai extracelular, duce nu intracelulare.

Diagnosticul de toxicitate metale grele este gravă şi trebuie să fie făcută de un medic pe baza simptomelor clinice în legătură cu testele de laborator. Agenți de chelare sunt potențial toxici şi nu ar trebui să fie utilizați decât dacă este absolut indicat. Toți agenții de chelare au atât minore si pune viata in pericol efecte secundare. Acestea trebuie să fie utilizate sub supravegherea unui medic într-un cadru spital.Efectele secundare ale CaNa2-EDTA includ: 2 Ne concentrăm pe CaNa2-EDTA, pentru că este de departe cel mai frecvent utilizate agentului de chelare promovate de către practicanții vraci pentru alte utilizări decât intoxicatii

dovedit metale grele. Trebuie amintit faptul că, deşi CaNa2-EDTA a fost unul dintre agenții de dispoziție pentru prima dată, nu mai este tratamentul de alegere pentru orice toxicitate de heavy metal.
Care sunt creanțe vraci pentru tratament chelator? 1
După ce EDTA a fost gasit eficace in chelator şi îndepărtarea metalelor toxice din sange, unii oameni de stiinta a postulat că arterele intarit ar putea fi înmuiat în cazul în care de calciu in peretii lor a fost eliminat.Prim indiciu care ar putea beneficia de tratament EDTA pacientii cu ateroscleroza a venit de la Clarke, Clarke, şi Mosher, care, în 1956, a raportat că pacienții cu boli vasculare periferice ocluzive au spus ca simtit mai bine după tratamentul cu EDTA.
În 1960, Meltzer et al, care au studiat zece pacienți cu angină pectorală., A raportat că nu au existat dovezi obiective de îmbunătățire în oricare dintre ele care ar putea fi atribuită la cursul tratamentului de chelare EDTA. Cu toate acestea, în următoarele două luni, cei mai multi pacienti au inceput de raportare neobişnuite ameliorare a simptomelor lor. Determinat de aceste rezultate, Kitchell et al. studiat efectele de chelare, la 28 pacienți suplimentare şi bazeze pe reevaluarea cursul celor zece pacienți a utilizat în procesul inițial [2].
Ei au descoperit că, deşi 25 din cele 38 de pacienti au avut expuse modele de îmbunătățit anginoase şi jumătate au arătat îmbunătățiri în practicile electrocardiografice câteva luni după tratament au început, aceste efecte nu au fost de durată. La momentul raportului, 12 din cele 38 au murit şi doar 15 au raportat simti mai bine. (Această "îmbunătățire", nu a fost semnificativă, cu toate acestea, pentru că nu era mai bună decât s-ar fi aşteptat cu metode dovedite şi pentru că nu a existat nici un grup de control pentru comparație.) Kitchell et al. a concluzionat că chelatizare EDTA, aşa cum este folosit în acest studiu, a fost "nu este un instrument util clinic în tratamentul bolii coronariene."
Susținătorii susțin că tratamentului de chelare este eficient impotriva aterosclerozei, boala coronariana, si boli vasculare periferice. Beneficiile sale ar trebui sunt multiple şi includ cresterea circulatiei sanguine colaterale; grosime de sânge a scăzut; îmbunătățirea funcției celulelor membrana; imbunatatit intracelular organelle funcție; a scăzut vasospasm arterial; a scăzut formarea radicalilor liberi, inhibarea procesului de imbatranire; inversare a aterosclerozei, scădere în angina; inversare de cangrena, îmbunătățirea de culoare a pielii, de vindecare a ulcerului diabetic.

Unii susțin de asemenea că chelare este eficace împotriva artrita, scleroza multipla, boala Parkinson, psoriazis, boala Alzheimer, precum şi probleme cu vederea, auzul, mirosul, coordonare musculara, si potenta sexuala.
Cerere primar în prezent la modă este faptul că de chelare a dizolva depozitele de calciu prezente in placi, care bloca si va infunda arterele. Nu există absolut nici un agent cunoscut faptul ca poate sa "dizolve" placi aterosclerotice şi invers ", de rigidizarea arterelor Aceste placi sunt foarte complexe şi constau de ingrosare a peretelui muscular al arterei în plus față de calciu şi de depozite de colesterol.. Dacă a existat o magie poțiune ar fi un pariu sigur că companiile farmaceutice şi medicii de legitime ar fi o folosesc!
În plus, CaNa2-EDTA este eficientă numai în chelare metale grele extracelulare (care a gasit dizolvat în sânge şi alte fluide ale corpului in afara de celule).

Diverse studii au fost citate de către suporterii tratamentului de chelare pentru ateroscleroza, cu toate acestea, niciuna dintre aceste beneficii susținut a fost demonstrată de bine concepute studiile clinice.

concluzie

Tratamentului de chelare ar trebui să fie folosite numai pentru toxicitate de heavy metal care a fost diagnosticat de un medic de renume. Nu are nici un loc în inversare sau de prevenire a aterosclerozei, angină pectorală, hipertensiune arterială, circulație proastă sau alte cardiovasculare (boli cardiace).

CaNa2-EDTA se pot infiltra în alte metale esențiale, cum ar fi fier, zinc, cupru şi magneziu din sânge provoacă efecte adverse asupra sănătății în timp ce care nu au nici un efect asupra placi calcifiata aterosclerotice.

Deşi nu dorim pentru a minimiza problemele cauzate de toxicitate de metale grele, în general, aceasta este destul de rară şi necesită în mod normal expunerii specifice sau factori de risc. Marea majoritate a oamenilor nu vin în contact semnificativ cu metale grele toxice.

n cazul în care persoana solicita afacerea dvs., susținând că toxicitatea metalelor grele, ar putea fi o problema pentru tine şi vrea să facă testarea şi tratamentul sfatul nostru este să se întoarcă şi a alerga. Dacă sunteți în cauză s-ar putea fi factori de risc sau a expunerii la metale grele toxice vizita un medic de renume.

Bibliografie

Chelation Therapy- Unproven Claims and Unsound Theories" by Saul Green, Ph.D. @: http://www.quackwatch.com provides a comprehensive review of chelation therapy well worth reviewing for those interested in learning more)

Heavy Metals.by Marsha D. Ford in: Emergency Medicine- A Comprehensive Review, 4th ed., Tintinalli, JE., Ruiz, E., and RL. Krome editors, 1996, pp.833-841

Graeme KA, Pollack CV Jr. 1998 Jan-Feb;16(1):45-56. Heavy metal toxicity, Part I: arsenic and mercury. J Emerg Med.

Graeme KA, Pollack CV Jr.Heavy metal toxicity. I: arsen and mercury. J Med Emerg. 1998 16 (1) :45-56.

THOMAS F. Criminal poisoning by administration of a douche of corrosive sublimate. Ann Med Leg Criminol Police Sci Toxicol. 1953 Apr-May;33(2):123-9.

AUGUSTINE JR. Mercury bichloride (corrosive sublimate) poisoning. Can Med Assoc J. 1956 Mar 1;74(5):371-2.

MONTUSCHI E. Mercuric chloride poisoning treated with dimercaprol. Br Med J. 1953 Sep 5;2(4835):545.

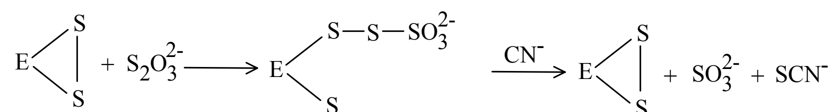
Arena JM. Treatment of mercury poisoning. Mod Treat. 1971 Aug;8(3):619-25.

CAP. V. OTRĂVURI FOARTE PUTERNICE

ACIDUL CIANHIDRIC

Acidul cianhidric, HCN, este un lichid incolor în stare pură care, la 26 °C, se transformă într-un gaz incolor, cu miros uşor de migdale amare. Este uşor solubil în apă şi miscibil în orice proporție cu majoritatea solvenților organici.Are un miros specific de migdale amare care este perceput la o concentrație de 1μg/l aer, în funcție de sensibilitatea personală. Este folosit în silozuri pentru combaterea rozătoarelor şi insectelor. Ca gaz de luptă nu mai este utilizat deoarece se dispersează rapid în atmosferă. Poate fi uşor obținut din sărurile sale prin tratare cu acizi tari, deoarece acidul cianhidric este un acid slab ce poate fi uşor deslocuit din acestea. Ferocianura de potasiu este inofensivă şi se utilizează în agricultură şi în alte domenii fără niciun risc. In prezența acidului sulfuric ce poate fi procurat uşor de la bateriile de automobil, aceasta eliberează acid cianhidric, volatil şi otrăvitor. Sărurile sale, cianura de sodiu (mai rar folosită în tehnică datorită higroscopicității sale) şi cianura de potasiu (utilizată la extracția aurului, galvanoplastie, etc.) sunt otrăvitoare provocând moartea unui om adult în cantități de 100-200 mg.

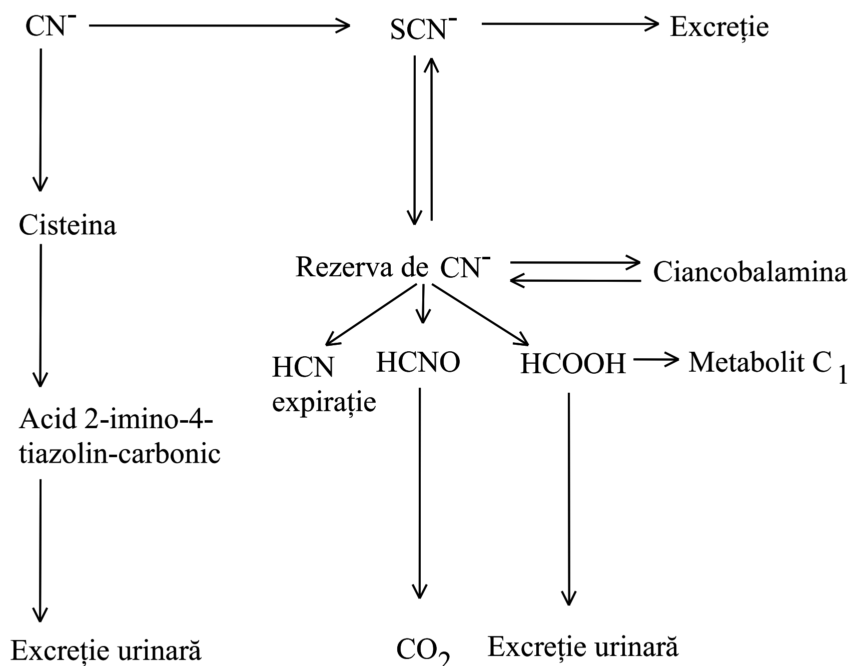
Toxicocinetică. Acidul cianhidric se absoarbe repede pe cale respiratorie (sub formă de gaz), transcutanat (mai lent) şi digestiv. Cianurile alcaline pătrund prin ingerare şi transcutanat (acțiune corozivă asupra tegumentelor care favorizează pătrunderea). Se distribuie în toate țesuturile, dar nu se acumulează. Metabolizarea majoră (80%) se realizează prin detoxicare la sulfocianură, SCN^-, cu toxicitate redusă, sub acțiunea rodanazei (tiosulfat: cianuri-sulftransferaza). Se consideră că sulful provine din aminoacizii sulfurați, iar cedarea sulfului se realizează prin intermediul tiosulfatului; de asemenea că rodanaza are o grupare disulfură activă:



Eficiența reacției de detoxicare este limitată de cantitatea redusă de rodanază din organism. Căile secundare de metabolizare (20%) includ: reacția cu cisteina; oxidarea la HCNO, apoi la CO_2 ; hidroliza la HCOOH; formarea de ciancobalamină. Numai o parte mică se elimină ca atare pe cale respiratorie.

Toxicodinamie. Toxicitatea acidului cianhidric se datoreşte capacității ionului CN^- de a inhiba un număr mare de enzime tisulare, în special a citocromoxidazei, împiedicând astfel utilizarea oxigenului molecular de către celule în procesul respirației celulare. Într-o prima fază a lanțului respirator are loc transferul hidrogenului şi a ionilor de hidrogen, H^+, de la substrat, iar în faza a doua, are loc transferul electronilor (e^-) cu ajutorul citocromilor, într-o ordine dependentă de potențialul lor redox. Intervine întâi citocromul b, apoi citocromii c şi, în final, "citocromoxidaza" (cit.a + cit.a_3), când oxigenul activat($1/2\ O_2^{2-}$) se uneşte cu 2 H^+ pentru a forma apă. Ionul cian inhibă citocromoxidaza prin blocarea Fe^{3+}, întrerupând lanțul respirator şi deci împiedicând utilizarea oxigenului de către celule, ceea ce conduce la asfixie celulară. Sângele rămâne saturat cu oxigen, ceea ce explică culoarea roşie-vişinie a pielii în

intoxicația acută fatală cu HCN. Complexul cian-citocromoxidază disociază pe măsură ce ionul CN^- este detoxicat la SCN^-. Ionul cian se combină şi cu hemoglobina, dar în proporții foarte mici, lipsite de importanță toxicologică. Acesta reacționează cu MetHb cu formare de CNMetHb (cianmethemoglobină); MetHb are afinitate mai mare pentru CN^- decât ciancromoxidaza, iar CNMetHb este mai puțin toxică decât CN^-. Dacă doza nu este fatală, ionul CN^- este eliberat progresiv de către citocromoxidază sau methemoglobină şi transformat în tiocianat, compus netoxic care se elimină prin urină.



Toxicocinetică: metabolizarea ionului cian (după Goodman si Gilman)

Doza letală (ingerare) este 100 mg pentru HCN şi 200 mg pentru NaCN şi KCN. O concentrație de peste 270 mg/m^3 este mortală.

Expunerea la concentrații mari de vapori (peste 300 mg/m^3) de HCN provoacă intoxicația supraacută cu evoluție mortală în câteva minute. Intoxicatul prezintă amețeli, palpitații şi dispnee, urmate de comă, convulsii, stop respirator şi stop cardiac. Expunerea la concentrații mari, între 150 şi 300 mg/m^3, provoacă intoxicația acută, curabilă. Primele semne constau în gust amar, senzație de sufocare, amețeli, dureri intense de cap, slăbiciune musculară şi stare confuzională, la care se adaugă hipersalivație, greață, vărsături şi dispnee.

Această simptomatologie dispare dacă victima părăseşte locul accidentului.

Expunerea la concentrații mici de HCN (25-65 mg/m^3) provoacă cefalee, vărsături, tulburări de echilibru şi uneori confuzie mintală. Fenomenele dispar în câteva ore după ce bolnavul a părăsit mediul poluat.

Inhalarea în doze subletale (sub 20 mg/m^3) este curabilă numai dacă intoxicatul a fost scos imediat din mediul toxic şi dacă tratamentul s-a aplicat cât mai repede posibil, chiar la locul accidentului.

Recomandări:

– persoanele care urmează să lucreze cu HCN trebuie să fie instruite asupra pericolelor la care sunt expuse;

– trebuie să existe în dotarea laboratorului sau secției suficiente aparate pentru protecția respirației;

– este necesar ca încăperile în care se lucrează cu HCN să fie înzestrate cu un sistem de detectare automată şi semnalizare a concentrațiilor nocive, precum şi un număr suficient de aparate de tip "Dräger" pentru detectare;

– instalațiile în care se produce HCN să fie perfect etanşe;

– ventilația din laboratoarele sau încăperile de lucru trebuie să fie foarte eficace;

– încăperile în care se pot acumula cantități mai mari de HCN, trebuie să fie prevăzute cu o instalație de stropire cu apă pentru captarea vaporilor de HCN;

– apele reziduale şi de spălare trebuie tratate înainte de a fi deversate în sistemul de canalizare. Distrugerea HCN se poate efectua prin introducerea clorului cu adăugare simultană de alcalii sau prin reacție cu alcalii şi săruri de fier. Procesul trebuie controlat prin analize, menținându-se un pH de minimum 11;

– intervențiile în instalații trebuie să fie executate numai cu aprobarea conducătorului de lucrare sau de secție. În toate cazurile se foloseşte materialul de protecție necesar, inclusiv masca cu cartuş adecvat;

– înainte de intervenție, toate componentele instalației vor fi spălate cu o mare cantitate de apă. Dacă se folosesc alcalii, locul se va neutraliza cu acid diluat şi apoi se va spăla cu o mare cantitate de apă caldă;

– fumatul, utilizarea luminii deschise şi a flăcărilor vor fi strict interzise;

– instalația electrică din laboratoarele de lucru va fi de tipul antiex;

– spațiile de lucru vor fi prevăzute cu duşuri şi dispozitive de spălare a ochilor prin pulverizare cu apă.

Primul ajutor:

– intervenția de prim ajutor comportă extremă urgență;

– accidentatul va fi scos imediat din zona contaminată şi dus într-o încăpere caldă şi bine ventilată;

– îndepărtarea hainelor şi decontaminarea tegumentelor cu apă şi săpun;

– inhalarea imediată de nitrit de amil 1 fiolă (pe compresă); operația se repetă din 5 în 5 minute, cel mult 20 minute;

– se va evita asfixierea prin căderea limbii, resturi alimentare etc;

– în caz de stop respirator se face respirație artificială cu oxigen pur (este contraindicată respirația gură la gură), concomitent cu inhalarea de nitrit de amil 1 fiolă (pe compresă), care se repetă din 5 în 5 minute, cel mult 20-25 minute;

În intoxicația prin ingestie se va proceda astfel:

– inhalarea imediată de nitrit de amil o fiolă (pe compresă); operația se repetă din 5 în 5 minute, cel mult 25 minute;

– spălătură gastrică cu $KMnO_4$ 1/5000, H_2O_2 3% şi $Na_2S_2O_3$ 1%;

— când spălătura gastrică nu este posibilă, se recomandă ingerarea de cantităţi mari din aceleaşi soluţii, urmată de provocarea de vărsături;

— administrarea de purgative saline;

— oxigenoterapie;

— se va anunţa medicul care va conduce mai departe tratamentul necesar.

Analiza toxicologică foloseşte:

— hârtie indicator bazată pe reacţia de formare a ferocianurii ferice albastre;

— detectare cu tuburi indicatoare "Dräger";

— dozare argenimetrică. Se recoltează aerul într-un vas absorbant care conţine o soluţie de $AgNO_3$ N/20 acidulată cu HNO_3, efectuîndu-se apoi dozarea gravimetric sau volumetric prin metoda Volhardt;

— dozarea colorimetrică a izopurpurinei formate prin captarea acidului cianhidric într-o soluţie de acid picric şi alcalinizare cu Na_2CO_3. Compararea se face cu o scară etalon artificială de bicromat de potasiu,;

— metoda bazată pe transformarea în bromcian şi apoi aldehidă glutaconică, urmată de cuplarea cu acid barbituric şi spectrofotometrare;

— reacţia Schőnbein – hârtia îmbibată cu soluţie de $CuSO_4$ şi tinctură de guaiac se colorează în albastru;

— reacţia Castaldi – hârtia îmbibată cu soluţie de acetat cupric şi benzidină se colorează în albastru;

— din medii biologice (corpuri delicte) se izolează prin distilare în mediu de acid tartric; se captează distilatul în NaOH şi se identifică CN^- prin reacţia Liebig (formarea tiocianatului feric) şi prin reacţia Chelle (formarea albastrului de Prusia).

Câteva cazuri de otrăvire. Cianura determină hipoxie intracelulară datorită legării reversibile de citocrom oxidaza mitocondrială. Semnele şi simptomele intoxicaţiei cu cianură apar de obicei în mai puţin de 1 minut după inhalare şi în câteva minute după ingestie. Manifestările precoce includ anxietate, dureri de cap, ameţeală, incapacitatea de concentrare şi midriază (Hamel, 2011). Dacă hipoxia progresează, scade nivelul de conştiinţă, apar convulsii şi comă. Pielea poate arata normal sau uşor cenuşie, iar saturaţia cu oxigen arterial poate fi normală. Tratamentul în Statele Unite îl reprezintă antidotul pentru cianură cu hidroxicobalamină. Hidroxicobalamina detoxifică cianura prin legare cu aceasta şi excretare prin urină a ciancobalaminei netoxice. Pentru că reacţionează cu cianura fără să formeze methemoglobină, hidroxicobalamina poate fi utilizată pentru a trata pacienţii, fără a compromite capacitatea de transport a oxigenului de către hemoglobină.

Un bărbat în vârstă din Sri Lanka a fost înjectat cu o seringă în abdomen în timp ce doarmea. Acesta a dezvoltat progresiv insuficienţă respiratory şi comă şi a murit o oră mai târziu (Abeyasinghe et al. 2011). Constatările de autopsie şi a analizelor de laborator au confirmat moartea ca fiind cauzată de intoxicaţia cu cianură. Astfel cianura poate fi mijlocul de asasinat în cazul în care se observă o moarte rapidă cu insuficienţă respiratorie progresivă, după injectarea unei substanţe necunoscute. In suicidare, accident şi crimă ste frecventă intoxicaţia cu cianură prin ingestie nu prin injectare.

Au mai fost studiate 17 sinucideri cu cianură în New York într-un interval de zece ani (Gill et al. 2004). Au predominat oamenii de știință, bijutieri şi lucrători în metal. Paisprezece din cele 17 victime au fost bărbați. S-a folosit un test de culoare pentru screening-ul pentru cianură cu confirmare şi determinare cantitativă prin cromatografia de gaz.

A fost prezentat un caz de sinucidere mai puțin obişnuită prin ingerarea orală de cianură de potasiu şi inhalare de HCN (Musshoff et al. 2011). Un comerciant de 48 de ani a fost găsit mort în maşina sa. Un miros penetrant de migdale amare a fost observat la deschiderea uşilor. Un aragaz de camping şi o oală de gătit care conțineau cantități mari de cristale albastre inchis au fost găsite în zona picioarelor în maşină. O pulbere albă a fost găsită pe degete şi în jurul gurii. În plus, s-au găsit flacoane care conțin tipuri ferocianură de potasiu şi diferiți acizi, împreună cu informații de pe internet, despre ferocianură şi cianură de potasiu.

La autopsie s-au observat hemoragii şi eroziuni ale mucoasei tractului respirator, esofagului şi stomacului. Concentrațiile de cianură au fost 0,2 mg / l în conținutul stomacal, 0,96 mg / kg în țesutul cerebral, 2.79 mg / kg în plămâni şi 5,3 mg / l în sânge. Acest caz se referă la o persoană care nu a fost familiarizată cu substanțe chimice, dar care obține informații profesionale prin intermediul internetului, pentru o sinucidere complexă.

Antidoturi. Compuşii care conțin grupări carbonilice pot reacționa uşor cu cianurile (Moore et al. 1986). Acidul piruvic, un acid alfa-cetocarboxilic, are efecte antagonice față de cianură. Se sugerează că mecanismul său de acțiune se bazează pe capacitatea sa de a reacționa cu cianuri. Acidul alfa-ketoglutaric, de asemenea, un acid alfa-cetocarboxilic, a fost evaluat pentru capacitatea sa de a contracara efectele letale de cianură (Bhattacharya et al., 2001.). Acesta a crescut valoarea DL_{50} pentru cianură (6,7 mg / kg) de cinci ori, o valoare statistic echivalentă cu cea constatată la soareci pretratați cu tiosulfat de sodiu şi nitrit de sodiu. Amestecul de acid alfa-cetoglutaric şi tiosulfat de sodiu a crescut valoarea DL_{50} a cianurii la 101 mg / kg. Adaosul de nitrit de sodiu la acidul alfa-cetoglutaric şi tiosulfat de sodiu a crescut valoarea DL_{50} a cianurii la 119 mg / kg. Spre deosebire de nitrit de sodiu, nu induce formarea de methemoglobină. Reiese din aceste studii că administrarea de acid alfa ketoglutaric şi tiosulfat de sodiu conduce la mai puține decese fără formarea de methemoglobină care este periculoasă.

Au fost propuse o serie de promedicamente bazate pe 3-mercaptopiruvat ca substrat pentru enzima 3-mercaptopyruvate/cyanide (3-MPST) sulfurtransferază, care converteşte cianura la tiocianat netoxic (Nagasawa et al. 2007). Aceste promedicamente, care sunt foarte eficiente antidoturi pentru cianură, sunt unice fiind luate pe cale orală, dar pot fi administrate până la o oră înainte de cianură ca agent profilactic, putând fi administrate şi parenteral.

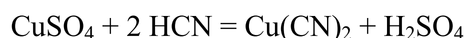
Toxicologia analitică a acidului cianhidric

Izolare. HCH se izolează din aer în soluții absorbante, iar din produse biologice şi alte produse, prin distilare în mediu slab acid.

Identificare. Depistarea mirosului de migdale amare, procedeul nu este recomandat, fiind riscant. Identificarea se face din aer, conținut stomacal, organe, sânge. Se execută cu ajutorul

hârtiilor indicatoare; în cazul organelor (conținut stomacal), hârtiile se suspendă pe capacul recipientelor în care se găsesc produsele, având grijă să nu vină în contact cu acestea.

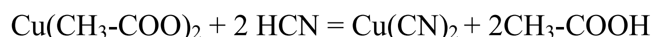
Reacția Schönbein: hârtia îmbibată cu sulfat de cupru 0,05%, apoi cu guaiac 4% în alcool, se colorează în albastru în prezența acidului cianhidric. Reacția se bazează pe proprietatea acidului cianhidric de a mări potențialul oxidant al cuprului, care singur nu oxidează guaiacul, dar în prezența acidului cianhidric îl oxidează la ozonidă guiaconică, după reacțiile:


$CuSO_4 + 2\ HCN = Cu(CN)_2 + H_2SO_4$

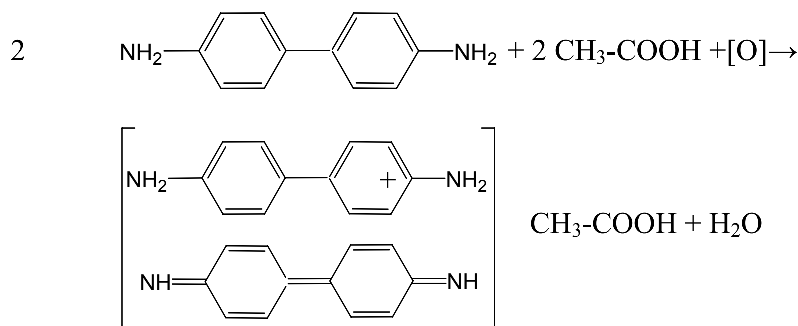

$2\ Cu(CN)_2 + H_2O = Cu(CN)_2 + 2\ HCH + [O]$

Reacția este sensibilă (1/300000), aproape instantanee, dar nespecifică, fiind dată ți de substanțele oxidate (clor, ozon, etc.).

Reacția Castaldi: hârtia îmbibată în acetat de cupru 0,28% şi apoi în acetat de benzidină 0,5%, se colorează în albastru în prezența acidului cianhidric. Reacția se bazează pe o dismutație cu formare de oxigen în stare născândă, care oxidează benzidina la produsul merichinoic, albastru:

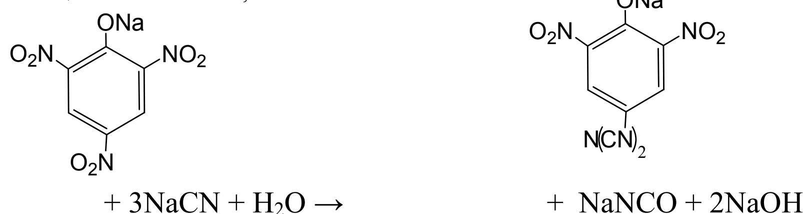

$Cu(CH_3\text{-}COO)_2 + 2\ HCN = Cu(CN)_2 + 2CH_3\text{-}COOH$


$2\ Cu(CN)_2 + H_2O = Cu_2(CN)_2 + 2\ HCH + [O]$



Reacția este sensibilă, dar nespecifică.

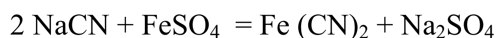
Reacția Guignard: hârtia tratată cu acid picric 1%, uscată, apoi cu Na_2CO_3 5% şi uscată la temperatura camere se înroşeşte prin formarea izopropanolului în prezența acidului cianhidric, conform reacției:



Reacția este specifică, sensibilă, dar se desfăşoară lent.

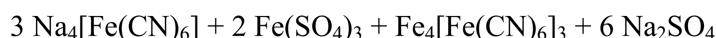
Reacția Chelle – Regnier se bazează pe oținerea albastrului de Prusia (albastru de Berlin). La 5 ml distilat se adaugă o picătură soluție fenoftaleină, apoi se acidulează cu H_2SO_4 0,1 N şi se realcalinizează net cu borax, până la apariția culorii roz (dacă culoarea dispare, se mai

adaugă borax); se adugă câteva picături de $FeSO_4$ 2%, apoi se acidulează uşor cu 4 – 5 picături HCl conc. Apare o colorație albastră datorită formării ferocianurii ferice. Reacțiile care au loc sunt:


$2\ NaCN + FeSO_4 = Fe\ (CN)_2 + Na_2SO_4$


$Fe\ (CN)_2 + 4\ NaCN = Na_4[Fe(CN)_6]$

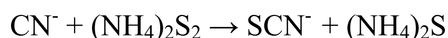

$6\ FeSO_4 + 3/2\ O_2 + 3\ H_2O = Fe(SO_4)_3 + 2\ Fe(OH)_3$

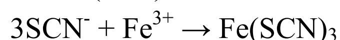

$3\ Na_4[Fe(CN)_6] + 2\ Fe(SO_4)_3 + Fe_4[Fe(CN)_6]_3 + 6\ Na_2SO_4$

Sensibilitatea reacției este de 1/ 100000. Pentru a mări sensibilitatea, se adaugă o picătură de $BaCl_2$, când se formează $BaSO_4$, care se depune şi antrenează colorantul albastu de Prusia (de Berlin). Reacția s-ar putea executa şi cu $FeCl_3$, însă excesul de $FeCl_3$ conferă soluției o culoare galbenă, care maschează culoarea verzuie a concentrațiilor mici de albastru de Berlin.

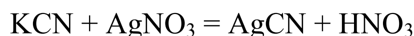
Reacția Liebig de formare a sulfocianurii ferice, se realizează încălzind la fierbere soluția de analizat cu câteva picături de polisulfură de amoniu 10%, când se formează sulfocianura de amoniu. Se acidulează cu acid clorhidric pentru distrugerea excesului de polisulfură, se filtrează şi se tratează cu $FeCl_3$ 1% (soluție proaspăt preparată), când apare o colorație roşie datorită sulfocianurii ferice.

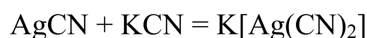
Reacția este specifică:

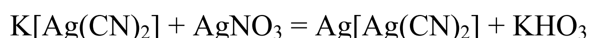

$CN^- + (NH_4)_2S_2 \rightarrow SCN^- + (NH_4)_2S$


$3SCN^- + Fe^{3+} \rightarrow Fe(SCN)_3$

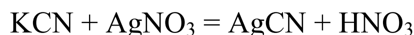
Reacția cu azotat de argint: se tratează soluția de analizat cu câteva picături de $AgNO_3$ 1%, când se formează un precipitat alb, insolubil în acid azotic, solubil în cianură alcalină. În exces de azotat de argint apare un precipitat alb de diciano argintat de argint:

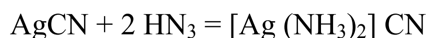

$KCN + AgNO_3 = AgCN + HNO_3$

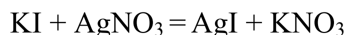

$AgCN + KCN = K[Ag(CN)_2]$


$K[Ag(CN)_2] + AgNO_3 = Ag[Ag(CN)_2] + KHO_3$

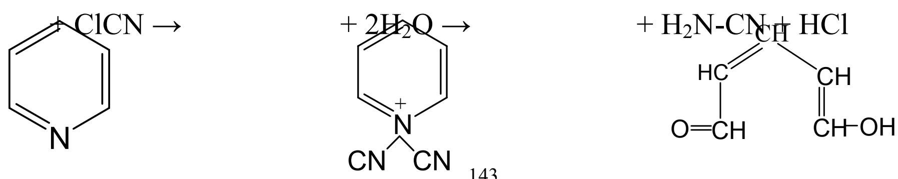
Reacția Dénigés se realizează cu azotat de argint şi iodură de potasiu: ionul CN^- formează cu $AgNO_3$, AgCN solubilă în amoniac, iar excesul de $AgNO_3$ reacționează cu KI dând AgI galbenă, insolubilă în amoniac.


$KCN + AgNO_3 = AgCN + HNO_3$

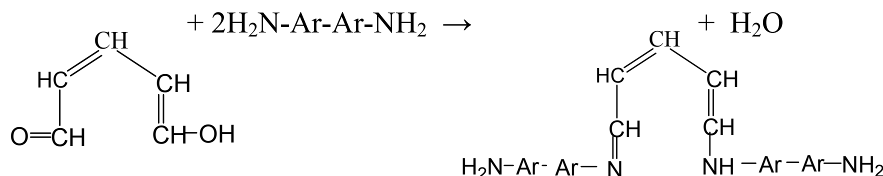

$AgCN + 2\ HN_3 = [Ag\ (NH_3)_2]\ CN$


$KI + AgNO_3 = AgI + KNO_3$

Reacția de formare a bromurii (clorurii) de cianogen: ionul CN^- formează cu apa de brom (clor), bromură (clorură) de cianogen. Aceasta se combină cu nucleul piridinic, deschizându-l, cu formare de aldehidă glutaconică, care se cuplează cu diamine aromatice (de exemplu: benzdina), obținându-se baza Schiff, roşie (tehnica Truhaut) sau cu antipirina dimetilică, dând culoare albastră (tehnica Epstein).



aldehida glutaconica



Dozarea spectrofotometrică a acidului cianhidric din aer

Metoda Chelle – Regnier. Principiu metodei se bazează pe reacția ionului de cianură cu sulfatul feros cu formare de ferocianură de potasiu care, tratată cu o sare ferică, formează albastru de Berlin, colorimetrabil.

Reactivi:

1. Soluție absorbantă NaOH, 0,1 N.
2. Soluție alcoolică de fenoftaleină 1%;
3. Acid sulfuric 0,1 N.
4. Soluție saturată de borax: se dizolvă prin încălzire 5 g borax în 100 ml apă distilată.
5. Soluție sulfat feros 2% (cu câteva picături de clorură ferică 2%).
6. Acid clorhidric concentrat.
7. Standard: se dizolvă 0,1 g KCN în 100 ml NaOH 0,1 N. Se titrează argentrimetric sau iodometric şi se stabileşte concentrația în CN^-: 10 ml soluție standard stoc se tratează cu 5 ml iodură de potasiu 20% şi se titrează cu azotat de argint 0,01 N până la apariția unei opalescenței alb – gălbui dată de iodura de argint.

1 ml $AgNO_3$ 0,01 N corespunde la 0,25 mg CN^-

8. Standard de lucru: Se diluează cu NaOH 0,1 N o parte alicotă din standardul stoc, astfel încât soluția să conțină 100 μg CN^-/ml. Soluția se prepară extemporaneu.

Recoltarea probelor

Se aspiră aerul prin două vase spălătoare, conținând fiecare 10 ml NaOH 0,1 N. Se recoltează 40 – 50 l aer cu viteza de 25 litri/oră, se notează 1 şi p.

Modul de lucru

Se iau câte 5 ml soluție absorbantă din fiecare vas spălător, se tratează cu o picătură fenoftaleină 1% când apare o culoare roşu – vişiniu, apoi se adaugă 5 ml acid sulfuric 0,1 N când soluția se decolorează (la nevoie se adaugă 2 -3 picături în plus). Se realcanizează net cu 2 ml soluție saturată de borax, când apare o culoare roz – vişinie, se agită şi se lasă 5 -10 minute în repaus. Se adaugă1 ml sulfat feros 2% când se formează un precipitat galben – verzui, apoi se adaugă 6 picături acid clorhidric concentrat, se agită până la dizolvarea precipitatului şi apariția unei colorații bleu – albastru. După 10 minute se măsoară extincția la spectrofotometru Spekol la λ = 720 nm, în cuva de 1 cm în compensație cu proba martor.

Curba de standardizare se face între 70 şi 150 μg ion CN^-, prin puncte din 20 în 20, în condițiile descrise mai sus.

Cu extincțiile obținute se construieşte, curba standard sau se calculează cu factorul de pantă.

Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba standard, apoi se înmulțesc cu 2 (pentru că s-a lucrat cu ½ din soluția absorbantă), obținându-se concentrația C a CN^- în µg .

Reactivi(ml)	Eprubeta					
	1	2	3	4	5	6
Standard de lucru(100 µg CN^- / ml)	0.7	0.9	1.1	1.3	1.5	-
Conc.µg	70	90	110	130	150	-
NaOH 0.1%	4.3	4.1	3.9	3.7	3.5	5.0
Fenolftaleină 1% sol. alcoolică	1 picătură					
H_2SO_4 0.1 N	2.0 agitare, 5'-10'repaus					
$FeSO_4$ 2 %	1.0 agitare					
HCl	6 picături, agitare, 10' repaus					

Λ=720nm

Calcul

Rezultatele se exprimă în mg CN^-/ m^3 aer.

$mg/m^3 = C / V$ în care:

C= concentrația CN^-, în µg

V= volumul de aer recoltat în litri.

Metoda colorimetrică pentru sulfocianură

Metoda Liebig se bazează pe determinarea sulfocianurilor din sânge (aer) şi urină; ionul SCH^- apare prin metabolizarea HCN sau în procesul de putrefacție. În mod fiziologic se produc sulfocianuri în organism, încât la persoanele normale se găsesc următoarele condiții:

- în ser: la nefumători până la 2 mg sulfocianură/100ml;

la fumători până la 3 mg sulfocianuri/100 ml;

- în urină: la nefumători până la 15 mg sulfocianuri/litru;

la fumători până la 26 mg sulfocianuri/litru.

Se consideră ca indice de expunere la compuşi ai cianului nivele sanguine peste 8 mg/100 ml şi eliminări urinare peste 30 mg/litru.

Când se urmăreşte CN^- în produse cadaverice este necesară transformarea HSCN în HCN prin oxidare cu acid cronic şi separare prin distilare a HCN (matoda Chelle). Astfel, HSCN formează complexul $Fe(SCN)_3$ (reacția Liebig).

Reactivi

1. Acid triclor acetic 1%;
2. Nitrat feric 5%; se dizolvă 12,5 g nitrat feric în 250 ml acid azotic 1 N.
3. Standard: sulfocianură (tiocianat) de potasiu 0,1% (aproximativ 1 ml = 1 mg).
4. Standard de lucru: se titrează soluția stoc cu $AgNO_3$ 0,1 N şi se calculează concentrația exactă de KSCN. Se diluează cu apă astfel, încât să se obțină o soluție 1 ml = 25 µg KSCN. Se prepară extemporaneu din soluția stoc care se titrează în aceeaşi zi.

Recoltarea probelor

Se recoltează sânge prin puncție venoasă, se centrifughează timp de 5 minute la 3000 turații/minut Se colectează urină în vas curat. Este indicat să se cerceteze sulfocianurile în aer şi în urină cât mai curând după expunerea probabilă (până la 24 ore).

Modul de lucru

Se pipetează 2 ml aer şi se adaugă 2 ml acid tricloracetic 10%, se agită şi după 10 minute se filtrează. Se pipetează 5 ml urină şi se adaugă 5 ml acid triclor acetic 10%, se agită, după 5 minute se filtrează. La 2 ml filtrat (corespunzând la 1 ml ser sau urină) se adaugă 3 ml nitrat feric şi se agită. În paralel se face un martor al reactivilor, cu 2 ml apă şi 3 ml nitrat feric 5% şi un martor alurinei cu 2 ml filtrat de urină şi 3 ml apă (aceasta se face pentru fiecare probă de urină). După 10 minute se citeşte extincția probelor de ser, la spectrofotometru Spekol la λ = 470 nm, în cuva de 1 cm, în compensație cu martorul reactivilor, obținându-se extincția E_S.

Pentru urină se măsoară atât extincția probelor (E_U), cât şi extincția martorului urinei (E_0), față de martorul reacivilor, în condițiile descrise mai sus (conform schemei).

Curba de standardizare se face între 10 şi 50 μg KSCN, prin puncte din 10 în 10, măsurând extincțiile față de martorul reactivilor. Cu extincțiile obținute se calculează factorul de pantă (A).

	Eprubeta		
Reactiv (ml)	Proba	Martorul urinei	Martorul reactivilor
Filtrat de urină	2.0	2.0	-
$Fe(NO)_3$ 5 % în HNO_3 1N	3.0	-	3.0
Apă distilată	-	3.0	2.0
Agitare, repaus 10' λ=470 nm			
E_u E_0			

Reactivi(ml)	Eprubeta					
	1	2	3	4	5	6(M)
Standard de lucru (25 μg SCN^- / ml)	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0	-
Conc.μg	10	20	30	40	50	-
Apă distilată	1.6	1.2	0.8	0.4	-	2.0
$Fe(NO_3)_3$ 5 % în HNO_3 1 N	3.0 agitare 10' repaus					

Calculul

- pentru ser: $E_S . A = C_S$, în μg KSCN.;
- pentru urină: $(E_U – E_0) . A = C_U$, μg KSCN.

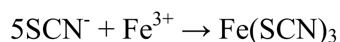
Rezultatele se exprimă în mg sulfocianură (KSCN) la 100 ml ser sau la litru urină. Întrucât proba luată în lucru reprezintă 1 ml ser sau urină, rezultatele sunt:

mg sulfocianură/100 ml ser = C_S . 0,1

mg sulfocianură/litru urină = C_U

Observații

1. În cazul mai multor determinări, când se lucrează în serie, pentru a nu se mai face pentru fiecare probă şi un martor al urinei, se procedează astfel: se lucrează probele, se citeşte extincția E_P şi api se adaugă în fiecare probă 1 – 2 picături $Hg(NO_3)_2$, şi soluție saturată şi se citeşte E_U.



$$5SCN^- + Fe^{3+} \rightarrow Fe(SCN)_3$$



$$Fe(SCN)_3 + Hg(NO_3)_2 \rightarrow Hg(SCN)_2 + Fe^{3+} + 2\ NO_3^- + SCN^-$$

Nu se foloseşte $HgCl_2$ deoarece este greu disociabilă.

2. Subiectul examinat nu va lua medicament conținând salicilați (aspirină antinevralgice,etc.) cu cel puțin 48 ore înainte de determinare, întrucât aceştea dau aceeaşi colorație cu sarea ferică.

Determinări curente

Cromatografia capilară cu detector cu captură de electroni a fost folosită la determinarea acidului cianhidric din fumul de țigară (Xu et al. 2006). Lindsay şi O'Hare (2006) determină amperometric acidul cianhidric din sânge.

Bibliografie specifică

Abeyasinghe, N. L., Perera, H. J. M., Weerasinghe, D. S. K. Case report - Death by subcutaneous injection of cyanide in Sri Lanka. J. Forensic Legal Med., 18, 182-183, 2011.

Bhattacharya, R., Kumar, D., Sugendran, K., Pant, S. C., Tulsawani, R. K., Vijayaraghavan, R. Acute toxicity studies of α-Ketoglutarate: a promising antidote for cyanide poisoning. J. Appl. Toxicol., 21, 495 – 499, 2001.

Drochioiu, G., Arsene, C., Murariu, M., Oniscu, C. Analysis of cyanogens with resorcinol and picrate. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3540–3545, 2008.

Drochioiu, G., Mangalagiu, I., Avram, E., Popa, K., Dirtu, A. C., and Druta, I. Cyanide reaction with ninhydrin: Evaluation of interference and mechanisms. *Analytical Sciences*, 20, 1443 – 1447, 2004.

Drochioiu, G. Highly selective and sensitive reaction of cyanide with 2,2-dihydroxy-1,3-indanedione. *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* 372(5-6) 744 – 747, 2002;

Drochioiu, G. Fast and highly selective determination of cyanide with 2,2-dihydroxy-1,3-indanedione. *Talanta,* 56(6) 1163 – 1165, 2002;

Drochioiu, G., Mangalagiu, I., Tataru, V. Specific spectrophotometric determination of hydrocyanic acid in the environment. *Analyst*, 125, 939-941, 2000.

Drochioiu, G., Popa, K., Humelnicu, D., Murariu, M., Sandu, I., Cecal, A. Comparison of various sensitive and selective spectrophotometric assays of environmental cyanide. *Toxicol. Environ.Chem.*, 90, 221-235, 2008;

Drochioiu, G., Oniscu, C., Şunel, V., Popa, K., Cozma, D. Cyanide assay based on its novel reaction with resorcinol and picric acid. *Eur. J. Min. Proc. Environ. Prot.*, 3(3) 291-296, 2003;

Drochioiu, G., Mangalagiu, I. Assay of cyanide in biological materials using 2,2-dihydroxy-1,3- indanedione. *Pakistan J. Appl. Sci.*, 2(6) 658 – 660, 2002;

Drochioiu, G., Mangalagiu, I., Popa, K., Avram, Ecaterina, Molnar, Ramona, and Druta, I. Novel reactions of cyanide with 2,2-dihydroxy-1,3-indanedione. *Rev. Roum. Chim.,* 50(1), 53 –59, 2005

Drochioiu, G., Şunel, V., Grebinişan, D., Vlahovici, A., Saiz, V., Murariu, M. Dosage des ions cyanure totaux par l'inhibition de l'activité catalasique. *Rev. Roum. Chim.,* 49(2) 121-125, 2004;

Drochioiu, G., Pui, A.,Dănac, R., Băsu, C., Murariu M. Improved spectrophotometric assay of cyanide with picric acid. *Rev. Roum. Chim.,* 48(8) 601-606, 2003;

Gill, J. R., Marker, E., Stajic, M. Suicide by cyanide: 17 deaths. *J. Forensic Sci*., **49**, 826-828, 2004.

Hamel, J. A review of acute cyanide poisoning with a treatment update. Critical Care Nurse, 31, 72-82, 2011.

Lindsay, A. E., O'Hare, D. The development of an electrochemical sensor for the determination of cyanide in physiological solutions. Anal. Chim. Acta, 558 , 158-163, 2006 .

Mihaescu, I. M., Drochioiu, G. Cyanide reaction with ninhydrin: the effect of pH changes and UV-Vis radiation upon the analytical results. *Rev. Roum. Chim*., 54(10) 841-845, 2009.

Moore, S. J., Norris, J. C., Ho, I. K., Hume, A. S. The efficacy of alpha-ketoglutaric acid in the antagonism of cyanide intoxication. Toxicol. Appl. Pharmacol., 82, 40-44, 1986.

Musshoff, F., Kirschbaum, K. M., Madea, B.An uncommon case of a suicide with inhalation of hydrogen cyanide. *Forensic Sci. Intern.,* 204, E4-E7, DOI: 10.1016/j.forsciint.2010.05.012, 2011.

Nagasawa, H. T., Goon, D.J., Crankshaw, D. L., Vince, R., Patterson, S. E. Novel, orally effective cyanide antidotes. *J. Med. Chem.,* 50, 6462-64624, 2007.

Xu, J., Tong, H., Yan, X. Y., Du, S., Yao, Z., Liu, S. Sensitive determination of cyanide in cigarette smoke by capillary GC with a microECD. Chromatographia, 64, 609-612, 2006.

CAP. VI METABOLIZAREA OTRĂVURILOR ÎN CORP

METABOLIZAREA PRESUPUNE CONVERSIA ENZIMATICĂ A OTRĂVURILOR ÎN METABOLIȚI CARE SUNT SUBSTANȚE CU CARACTER MAI POLAR, FIIND ASTFEL MAI UŞOR DE EXCRETAT ŞI, UNEORI, MAI PUȚIN TOXICI.

LA ORGANISMELE TERESTRE ÎNSĂ, BIOTRANSFORMAREA ESTE INDISPENSABILĂ, DEOARECE SUBSTANȚELE LIPOSOLUBILE SUNT REABSORBITE LA NIVELUL TUBULAR RENAL ŞI, DE ACEEA, FĂRĂ INTERVENȚIA METABOLIZĂRII, ELIMINAREA LOR AR FI DE ORDINUL ZILELOR ŞI CHIAR ANILOR (PENTRU ELIMINAREA ETANOLULUI AR FI NECESARE 24 DE ZILE). ORGANISMELE ACVATICE NU POSEDĂ SISTEME METABOLIZANTE PENTRU XENOBIOTICE, DEOARECE ELE EXCRETĂ COMPUŞII LIPOSOLUBILI DIRECT ÎN APĂ PRIN TOATĂ SUPRAFAȚA CORPORALĂ.

ORGANISMUL UMAN ARE POSIBILITATEA DE A METABOLIZA APROAPE TOATE STRUCTURILE CHIMICE CUNOSCUTE. TOȚI COMPUŞII EXOGENI SUFERĂ METABOLIZARE, CU EXCEPȚIA COMPUŞILOR PUTERNIC POLARI (ACIZII ŞI BAZELE TARI, MINERALI ŞI ORGANICI) ŞI UNII COMPUŞI NEPOLARI (ETER ETILIC, DIELDRIN ETC.).

METABOLIZAREA SE DATOREAZĂ FUNCȚIEI VITALE A ORGANISMELOR DE A SE PROTEJA DE COMPUŞII STRĂINI, CARE PĂTRUND SEPARAT SAU ODATĂ CU SUBSTANȚELE NUTRITIVE (VOICU ŞI OLINESCU, 1977) ŞI ARE LOC, DE REGULĂ, ÎN DOUĂ FAZE:

ÎN PRIMA FAZĂ, UN COMPUS, ACTIV SAU INACTIV BIOLOGIC, ESTE TRANSFORMAT PRIN REACȚII DE OXIDARE, REDUCERE SAU HIDROLIZĂ, ÎNTR-UN ALT COMPUS, ACTIV SAU INACTIV;

ÎN FAZA A DOUA, COMPUSUL INIȚIAL ÎMPREUNĂ CU PRODUSUL SĂU DE TRANSFORMARE SUFERĂ REACȚII DE CONJUGARE PENTRU A FORMA UN COMPUS INACTIV BIOLOGIC. ASTFEL, BENZENUL TRECE, ÎN PRIMA FAZĂ, PRIN OXIDARE DIRECTĂ SAU PRIN INTERMEDIUL UNOR REACȚII DE EPOXIDARE, ÎN FENOL, DI- ŞI TRIFENOLI, IAR ACEŞTIA SUFERĂ, ÎN FAZA A DOUA, O CONJUGARE, ÎN PRINCIPAL CU ACIDUL GLUCURONIC ŞI CU IONUL SULFAT. UNELE PRODUSE SE METABOLIZEAZĂ COMPLET ÎN PRIMA FAZĂ, CUM AR FI ETANOLUL, ÎN TIMP CE ALTELE TREC DIRECT ÎN FAZA A DOUA (FENOLUL).

PRIN METABOLIZARE, POLARITATEA COMPUSULUI CREŞTE ÎN GENERAL. COMPUSUL INIȚIAL, DE OBICEI LIPOSOLUBIL, DEVINE POLAR ÎN FAZA I ŞI MAI POLAR ÎN FAZA A II-A, CÂND ESTE PUTERNIC ACID (MAJORITATEA METABOLIȚILOR) SAU ALCALIN (PIRIDINA). FIIND POLARI, ACEŞTI ULTIMI METABOLIȚI STRĂBAT MAI GREU BARIERELE MEMBRANARE LIPOIDICE, IAR REABSORBȚIA TUBULARĂ ESTE REDUSĂ. SE CREAZĂ ASTFEL IMPRESIA CĂ BIOTRANSFORMAREA ARE ROLUL DE A MĂRI POLARITATEA ŞI, INDIRECT, DE A REDUCE TOXICITATEA XENOBIOTICELOR.

ETERUL ETILIC ŞI ACIDUL FTALIC SUNT ELIMINAȚI NEMODIFICAȚI, IAR UNELE SUBSTANȚE NEPOLARE, CUM AR FI HCH, INSECTICIDELE CLORURATE NU SUNT UŞOR METABOLIZATE ŞI NICI EXCRETATE FIIND DEPOZITATE ÎN ȚESUTURILE GRASE DIN ORGANISM.

FAPTUL CĂ O SINGURĂ OTRAVĂ POATE FI METABOLIZATĂ LA UN NUMĂR IMENS DE PRODUŞI SUGEREAZĂ CĂ ORGANISMUL NU-L RECUNOAŞTE ŞI CĂ ACEASTA INTERFERĂ DOAR CU SISTEMELE DE METABOLIZARE PE CARE CORPUL LE UTILIZEAZĂ DE REGULĂ PENTRU TRANSFORMAREA UNOR COMPUŞI EXOGENI ÎN COMPUŞII PROPRII. CU SUBSTANȚELE PE CARE CORPUL LE RECUNOAŞTE, DE EXEMPLU PROTEINELE, AMINOACIZII, GRĂSIMILE ETC. LUCRURILE STAU CU TOTUL ALTFEL: CĂILE METABOLICE SUNT PRECISE ŞI TRANSFORMAREA LOR SE PETRECE DE FIECARE DATĂ LA FEL. EXOGENUL PERTURBĂ BUNA FUNCȚIONARE A ORGANISMULUI SAU

DOAR A UNOR ȚESUTURI ŞI ORGANE ŞI, PRIN ACEASTA, INTRĂ ÎN REACȚIE CHIMICĂ SAU DE ALTĂ NATURĂ (FIZIOLOGICĂ, MECANICĂ ETC.) CU COMPONENTELE CORPULUI. ÎN CAZUL ÎN CARE OBIECTUL SAU COMPUSUL INTRODUS ÎN CORP NU AFECTEAZĂ ÎN NICI UN FEL STRUCTURA ŞI FUNCȚIILE ORGANISMULUI, ACESTA DIN URMĂ SE COMPORTĂ PASIV (PROTEZE DIN ARGINT SAU MATERIAL PLASTIC IMPLANTATE ÎN CORP).

REACȚIILE DIN FAZA I CONSTAU DIN INTRODUCEREA ÎN MOLECULĂ A GRUPĂRILOR CHIMICE CU POLARITATE CRESCUTĂ: -OH, $-NH_2$, -COOH, -SH. CEA MAI FRECVENTĂ DINTRE REACȚIILE ACESTEI FAZE ESTE OXIDAREA, ÎNSĂ PENTRU UNELE XENOBIOTICE REDUCEREA ESTE SINGURA CALE DE METABOLIZARE, ÎN TIMP CE ALTELE SE DEGRADEAZĂ PRIN HIDROLIZĂ.

REACȚII DE OXIDARE

SEDIUL METABOLIZĂRII POATE FI ORICE ȚESUT SAU ORGAN, ÎNSĂ SEDIUL PRINCIPAL ESTE FICATUL. ENZIMELE DE METABOLIZARE EXISTĂ ÎNSĂ ŞI ÎN ORGANELE ŞI ȚESUTURILE CARE FACILITEAZĂ INTRAREA ŞI IEŞIREA DIN ORGANISM (PIELE, RINICHI, PLĂMÂN, INTESTIN), PRECUM ŞI ÎN ALTE ȚESUTURI (OCHI, PLASMĂ ETC.). SEDIUL METABOLIZĂRII NU CORESPUNDE TOTDEAUNA CU SEDIUL PRINCIPAL AL ACȚIUNII TOXICE. ASTFEL, METANOLUL SE METABOLIZEAZĂ ÎN PRIMUL RÂND ÎN FICAT, DAR EFECTUL TOXIC SE EXERCITĂ LA NIVELUL RETINEI, SNC, RINICHIULUI; HIDROXILAREA 2-NAFTILAMINEI ARE LOC ÎN FICAT, DAR EFECTUL CANCERIGEN APARE ÎN VEZICA URINARĂ; PLUMBTETRAETILUL ESTE TRANSFORMAT ÎN PLUMBTRIETIL ÎN FICAT, DAR METABOLITUL ESTE TOXIC ÎN SPECIAL PENTRU SNC; ÎN CAZUL DIMETILNITROZAMINEI, SEDIUL METABOLIZĂRII – FICATUL – CORESPUNDE CU SEDIUL PRINCIPAL AL ACȚIUNII TOXICE.

TABELUL 2

REACȚIA	EXEMPLU	FORMULA GENERALĂ
HIDROXILAREA AROMATICĂ	BENZENUL ◎ FENOLI	AR-X ◎ HO-AR-X
HIDROXILAREA CATENEI ALIFATICE	FENAZONA ◎ 3-HIDROXI-FENAZONA	R-$(CH_2)_N$-CH_3◎ R-(CH_2)-CH_2OH
N-OXIDAREA	TRIMETILAMINA ◎ TRIMETILAMINO-N-OXID	R_3N◎R_3N◎O
S-OXIDAREA	CLORPROMAZINA ◎ S-OXIDUL CLORPROMAZINEI	R—S—R' ⟶ R—$S^{\oplus}$(OH)—R' ⟶ R–
O-DEZALCHILAREA	CODEINA ◎ MORFINĂ	R-O-CH_3 ◎ R-O-CH_2OH ◎ R-OH + HCHO
N-DEZALCHILAREA	MORFINA ◎ NORMORFINĂ	R-NH-CH_3 ◎ R-NH-CH_2OH ◎ R-NH_2 + HCHO

S-DEZALCHILAREA	METILTIOPURINA ◎ TIOPURINĂ	$R\text{-}S\text{-}CH_3$ ◎ $R\text{-}S\text{-}CH_2OH$ ◎ $R\text{-}SH + HCHO$
DEZAMINAREA OXIDATIVĂ	AMFETAMINA ◎ FENILACETONĂ	R, R', H, C, NH_2 → R, R', C, OH, NH_2 → R, R'
DESULFURAREA	PARATIONUL ◎ PARAOXON	R, R', P, S, X → R, R', P, O, X
EPOXIDAREA	ALDRINUL ◎ DIELDRIN	R - CH = CH - R' → R - CH - CH - R' (O)
OXIDAREA CU DESCHIDEREA CICLULUI	NICOTINA ◎ ACID Γ –- (3 PIRIDIL) – Γ – METI-AMNOBUTIRIC	R', CH_3, N, R → R', COOH, NH, R

IN ORGANISMUL UMAN ŞI ÎN CEL ANIMAL EXISTĂ DOUĂ TIPURI DE E*NZIME*: ENZIME *BIOCHIMICE* (PARAMETABOLICE) ŞI ENZIME *XENOBIOTICE* (XENOMETABOLICE).

PRIMELE, CELE BIOCHIMICE, CATALIZEAZĂ BIOTRANSFORMAREA SUBSTANȚELOR ENDOGENE, PRECUM ŞI METABOLIȚII ACESTORA CARE PREZINTĂ ASEMĂNĂRI STRUCTURALE CU SUBSTANȚELE ENDOGENE, DEOARECE, ODATĂ METABOLIZATE ŞI AJUNSE LA LOCUL DE ACȚIUNE A ENZIMELOR, ACESTEA NU LE MAI

POT DIFERENȚIA DE SUBSTRATELE LOR NORMALE ŞI LE METABOLIZEAZĂ PE ACEEAŞI CALE. ENZIME CA: ALCOOLDEHIDROGENAZA, ALDEHIDDEHIDROGENAZA, DOPA-DECARBOXILAZA, MONOAMINOOXIDAZA, COLINESTERAZELE NESPECIFICE PLASMATICE, GUANAZA, NUCLEOTIDAZELE, XANTINOXIDAZA DEGRADEAZĂ DEOPOTRIVĂ SUBSTRATELE NATURALE ŞI PE CELE STRĂINE, DAR SIMILARE CA STRUCTURĂ.

ENZIMELE *XENOBIOTICE* CATALIZEAZĂ BIOTRANSFORMAREA MAJORITĂȚII OTRĂVURILOR ŞI SUBSTANȚELOR CHIMICE INDUSTRIALE, POLUANȚILOR, MEDICAMENTELOR, CANCERIGENILOR, ADITIVILOR ALIMENTARI, CARE NU PREZINTĂ, CA ATARE SAU CA METABOLIȚI, ASEMĂNĂRI STRUCTURALE CU SUBSTRATELE NORMALE. ACESTE ENZIME AU SEDIUL ÎN *MICROZOMI* ŞI CATALIZEAZĂ ÎN SPECIAL REACȚII DE OXIDARE. ÎNCĂ DIN ANUL 1955, AXELROD A DEMONSTRAT EXISTENȚA UNUI SISTEM DE ENZIME CARE FOLOSESC NADPH (NICOTINAMIDĂ REDUSĂ) ŞI OXIGEN MOLECULAR, NUMITE *OXIDAZE CU FUNCȚII MIXTE MICROZOMIALE* (MICROSOMAL MIXED FUNCTION OXYDASES) SAU OFMM. ÎN MICROZOMI PE LÂNGĂ ACESTE ENZIME, SE MAI GĂSESC ŞI UNELE REDUCTAZE ŞI HIDROLAZE.

EXISTĂ ŞI SUBSTANȚE METABOLIZATE ATÂT PE CĂILE NORMALE, CÂT ŞI PE CELE CARACTERISTICE XENOBIOTICELOR. DE EXEMPLU, ETANOLUL SE OXIDEAZĂ ÎN CITOPLASMĂ PRIN INTERMEDIUL ALCOOLDEHIDROGENAZEI (ENZIMĂ BIOCHIMICĂ), IAR ÎN MICROZOMI PRIN INTERMEDIUL UNUI SISTEM ENZIMATIC ASEMĂNĂTOR.

ENZIMELE BIOCHIMICE SE MAI DEOSEBESC DE OFMM PRIN LOCALIZAREA, NUMĂRUL, SPECIFICITATEA ŞI ACTIVITATEA LOR.

ENZIMELE DE OXIDOREDUCERE BIOCHIMICĂ AU SEDIUL ÎN SPECIAL ÎN MITOCONDRII, ENZIMELE DE HIDROLIZĂ ÎN LIZOZOMI, CITOPLASMĂ, PLASMĂ SANGVINĂ, IAR OFMM SE GĂSESC APROAPE EXCLUSIV ÎN MICROZOMI.

ENZIMELE BIOCHIMICE SUNT DIVERSIFICATE ŞI ÎN CANTITATE SUFICIENTĂ PENTRU A SATISFACE METABOLIZAREA SUBSTRATELOR ENDO- ŞI EXOGENE; NUMĂRUL OFMM ESTE MIC SAU CHIAR REDUS LA UN SISTEM UNIC ŞI UNIVERSAL DE OXIDAZE.

ENZIMELE OFMM SUNT LIPSITE DE SPECIFICITATE, DEOARECE METABOLIZEAZĂ NUMEROASE SUBSTRATURI CU STRUCTURI DIFERITE, ÎN TIMP CE ENZIMELE BIOCHIMICE SUNT SPECIFICE.

ENZIMELE BIOCHIMICE SUNT ÎN STARE ACTIVĂ, PE CÂND OFMM SE ACTIVEAZĂ SUB EFECTUL DIRECT AL XENOBIOTICELOR, PUTÂND METABOLIZA ATUNCI COMPUSUL CARE LE-A ACTIVAT, PRECUM ŞI ALŢI COMPUŞI METABOLIZAŢI PE ACEEAŞI CALE. PROPRIETATEA SE NUMEŞTE INDUCŢIE ENZIMATICĂ.

REACŢII DE REDUCERE

REACŢIA	**EXEMPLU**
ALDEHIDE ◎ ALCOOL PRIMAR	R-CHO ◎ R-CH$_2$OH
CETONE ◎ ALCOOL SECUNDAR	R-CO-R′ ◎ R-CHOH-R′
SATURAREA DUBLEI LEGĂTURI	R-CH=CH-R′ ◎ R-CH$_2$-CH$_2$-R′
NITRODERIVAT ◎ NITROZODERIVAT ◎ ◎ HIDROXILAMINĂ ◎ AMINĂ	R-NO$_2$ ◎ R-NO ◎ R-NHOH ◎ R-NH$_2$
AZODERIVAT ◎ HIDRAZODERIVAT ◎ AMINĂ	R-N=N-R′ ◎ R-NH-NH-R′ ◎ ◎R-NH$_2$ + R′-NH$_2$
	R-CO-NHOH ◎ R-CO-NH$_2$
	R-S-S-R′ ◎ R-SH + R′-SH

ACID HIDROXAMIC ◎ AMIDĂ DISULFURĂ ◎ SULFHIDROL AS^{5+} ◎ AS^{3+}	R-ASO$(OH)_2$ ◎ R-AS=O

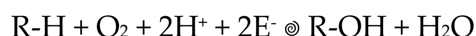
INDUCȚIA ENZIMATICĂ DETERMINĂ CREŞTEREA NIVELULUI ENZIMELOR IMPLICATE ÎN METABOLIZAREA UNEI OTRĂVI SAU XENOBIOTIC DUPĂ ADMINISTRAREA CRONICĂ A UNUI MEDICAMENT SAU TOXIC. ASTFEL, DATORITĂ NESPECIFICITĂȚII MARCATE, ADMINISTRAREA UNUI MEDICAMENT INDUCE O METABOLIZAREA CRESCUTĂ A ALTOR SUBSTANȚE (VOICU ŞI OLINESCU, 1977). DE PILDĂ, NICOTINA MĂREŞTE ACTIVITATEA ENZIMELOR CARE METABOLIZEAZĂ O SERIE DE MEDICAMENTE ŞI CHIAR METABOLISMUL NICOTINEI ESTE MAI INTENS LA FUMĂTORI FAȚĂ DE NEFUMĂTORI, PROBABIL DATORITĂ EFECTULUI INDUCTOR AL HIDROCARBURILOR POLICICLICE DIN ȚIGARĂ.

METABOLIZAREA MICROZOMIALĂ INCLUDE OXIDĂRI, REDUCERI ŞI HIDROLIZE.

REACȚII DE HIDROLIZĂ

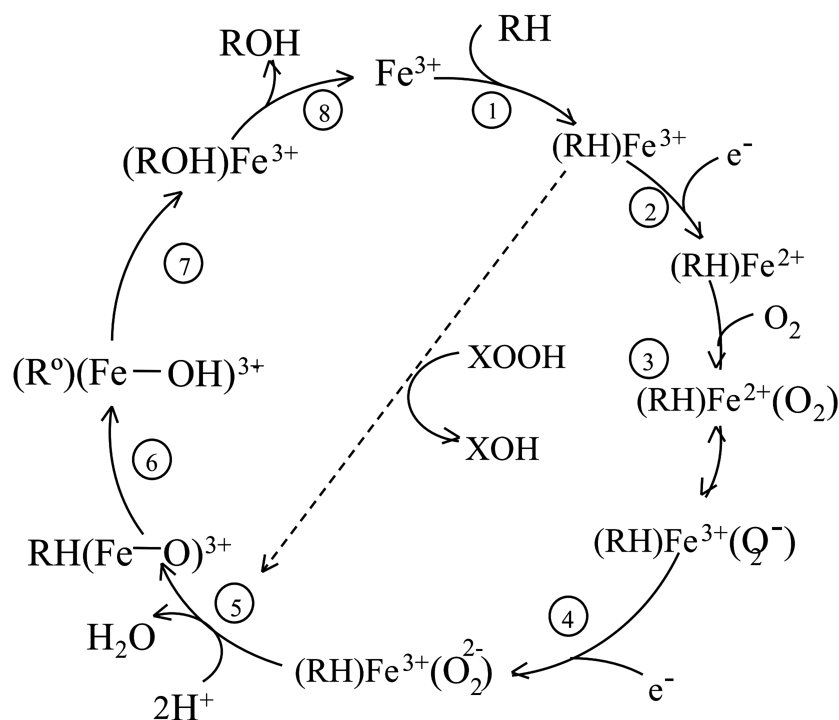
REACȚIA	**FORMULA GENERALĂ**	**EXEMPLU**
DEZESTERIFICARE DEZAMIDARE	R-COO-R′ ◎ R-COOH + R′-OH R-CONH-R′ ◎ R-COOH + R′-NH_2	ATROPINA ◎ACID TROPIC +TROPANOL LIDOCAINA ◎ ETILENGLICOCOL + XILINĂ

OXIDAREA ESTE REALIZATĂ DE OXIDAZELE CU FUNCȚII MIXTE MICROZOMIALE (OFMM), UN SISTEM ENZIMATIC COMPONENT AL MEMBRANELOR RETICULULUI ENDOPLASMATIC NETED (REN). ACEST SISTEM ESTE CONSTITUIT DIN DOUĂ HEMOPROTEINE (CITOCROMUL P_{450} ŞI CITOCROMUL B_5), DOUĂ FLAVOPROTEINE (NADPH-CITOCROM P_{450}-REDUCTAZA ŞI NADH-CITOCROM B_5-REDUCTAZA), O FOSFOLIPIDĂ (FOSFATIDILCOLINA). ÎN REACȚIE SUNT NECESARI: OXIGENUL MOLECULAR (O_2), NICOTINAMIDADENIN-DINUCLEOTIDFOSFATUL, FORMA REDUSĂ (NADPH) IAR UNEORI ŞI NICOTINAMIDADENIN-DINUCLEOTIDUL, FORMA REDUSĂ (NADH):



$$R\text{-}H + O_2 + 2H^+ + 2E^- \rightarrow R\text{-}OH + H_2O$$

ATÂT DISOCIEREA MOLECULEI DE OXIGEN CÂT ŞI DESFACEREA LEGĂTURII R-H DIN SUBSTRAT RECLAMĂ UN APORT CRESCUT DE ENERGIE DE ACTIVARE ŞI, DE ACEEA, ORGANISMUL REALIZEAZĂ ACEASTĂ OXIDARE ÎN OPT ETAPE:



ETAPELE ACTIVĂRII OXIGENULUI ÎN CICLUL CITOCROMULUI P_{450}

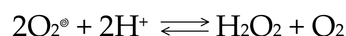
ÎN REACȚIILE DE HIDROXILARE MICROZOMIALĂ (DUPĂ COTRĂU, 1993).

1. CITOCROMUL P_{450} (NOTAT AICI CU FE^{3+}) SE UNEŞTE CU SUBSTRATUL NEPOLAR, R-H;
2. FIERUL HEMINIC FE^{3+} SE REDUCE LA FE^{2+} PRIN TRANSFERUL UNUI ELECTRON DE LA NADPH, PRIN INTERMEDIUL NADPH-CITOCROM P_{450}-REDUCTAZEI;
3. OXIGENUL MOLECULAR FORMEAZĂ UN COMPLEX TERNAR, $(RH)FE^{2+}(O_2)$;
4. UN AL DOILEA ELECTRON SE TRANSFERĂ DE LA NADPH (PRIN INTERMEDIUL NADPH-REDUCTAZEI) ORI DE LA NADPH SAU NADH (PRIN INTERMEDIUL CITOCROMULUI B_5) CU FORMAREA UNUI ANION PEROXIDIC;
5. ANIONUL PEROXIDIC LEAGĂ HIDROGENUL, CU FORMARE DE APĂ ŞI A COMPLEXULUI $RH(FE\text{-}O)^{3+}$;
6. HIDROGENUL DIN SUBSTRATUL R-H SE TRANSFERĂ PE OXIGEN, CU FORMAREA RADICALULUI INTERMEDIAR $(R^{O})(FE\text{-}OH)^{3+}$;
7. RADICALUL SUBSTRATULUI SE RECOMBINĂ CU OXIDRILUL DIN COMPLEX, CU FORMAREA PRODUSULUI DE HIDROXILARE, R-OH;
8. PRODUSUL R-OH REGENEREAZĂ FORMA OXIDATĂ A CITOCROMULUI P-450 ŞI CICLUL SE ÎNCHIDE.

HIDROPEROXIZII, X-OOH, PRECUM ŞI UNII OXIDANȚI PUTERNICI ŞUNTEAZĂ ACEST CICLU.

HIDROXILAREA TOXICILOR SE FACE ÎN MICROZOMII HEPATICI PRIN LABILIZAREA MOLECULELOR ACESTORA DATORITĂ INTRODUCERII GRUPĂRILOR ADIȚIONALE, MAI ALES A GRUPEI HO. CITOCROMUL P_{450} CONSTITUIE LOCUL ACTIVITĂȚII OXIGENULUI, FUNCȚIONÂND CA O MONOOXIGENAZĂ ÎN OXIDAREA UNOR SUBSTANȚE DIVERSE (HIDROCARBURI POLICICLICE, MEDICAMENTE, STEROIZI, COLESTEROL, ACIZI GRAŞI, , ETC.

SUPEROXID DISMUTAZA CATALIZEAZĂ DESCOMPUNEREA SUPEROXIDULUI PRINTR-O REACȚIE DE DISPROPORȚIONARE ÎN OXIGEN ŞI PEROXID DE HIDROGEN:



ACEASTA INHIBĂ REACȚIA DE HIDROXILARE SAU DEMETILARE ALE UNOR TOXICE, IAR ADĂUGAREA UNUI SISTEM GENERATOR DE SUPEROXID (XANTINĂ + XANTIN OXIDAZĂ) STIMULEAZĂ HIDROXILAREA UNOR TOXICE DE CĂTRE SISTEMUL ENZIMATIC MICROZOMIAL.

Se fac în continuare cercetări pentru a lămuri implicarea ramurii peroxidante din sistemul enzimatic microzomial. Există un vast material experimental în favoarea peroxidării lipidelor microzomiale în anumite condiții în cursul metabolizării medicamentelor. Vitezele reacțiilor de peroxidare a lipidelor microzomiale şi de hidroxilare a medicamentelor sunt invers proporționale, datorită probabil competiției pentru O_2 necesar ambelor procese. În ambele procese se dezvoltă forme reactive ale O_2 cum sunt $O_2^{-\cdot}$ şi $^1O_2$ (Auclair şi Lecomte, 1978).

Sistemul oxidazic cu funcții multiple este responsabil de procesul de detoxifiere hepatic, care începe prin introducerea unor grupări polare în structura substratului lipofil pentru a-l face mai hidrosolubil. Sistemul enzimatic microzomial cuprinde de asemenea un număr de reacții oxidative ca hidroxilări, O şi N-dealchilări, sulfoxidări etc. (Voicu şi Olinescu, 1977). Reacția principală de hidroxilare a unui substrat AH se datoreşte contactului direct cu citocromul P_{450} care este redus cu ajutorul unui flux de electroni primit de la NADPH prin intermediul celorlalți transportori.

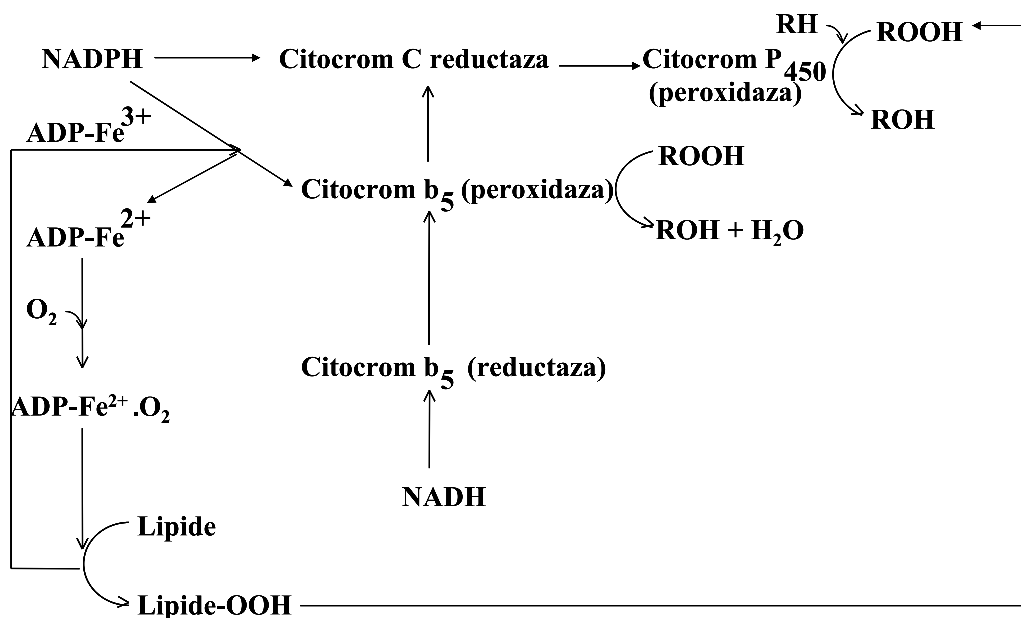
Peroxidarea este competitivă cu desaturarea şi cu N- şi O-dealchilarea (O'Brien, 1978).

Bidlack şi Hochstein (1975) menționează însuşirile de peroxidază ale hemoproteinelor din sistem (citocromii P_{450} şi b_5), cât şi condițiile în care apare peroxidarea lipidelor microzomiale: Fe^{3+} liber, dar mai ales complexat cu ADP sau pirofosfat.

In vivo se poate realiza peroxidarea lipidelor microzomiale din ficat. Mecanismul cel mai probabil se bazează pe structura hemoproteinică a componenților sistemului microzomial şi capacității acestora de a acționa ca peroxidaze. Producerea unor specii reactive, fie prin activarea O_2 ($^1O_2$), sau prin peroxizi (H_2O_2 sau lipidici), este sigură datorită chemiluminiscenței ce însoțeşte hidroxilarea microzomială *in vitro*. După O'Brien, O_2 şi citocromul P_{450} sunt componentele ambelor procese şi acestea pot realiza hidroxilarea unor medicamente. Ramura peroxidantă, deşi este mai simplă deoarece nu necesită prezența celorlalți citocromi, produce totuşi distrugerea citocromului P_{450}. O dovadă suplimentară a posibilității peroxidării lipidelor microzomiale este adusă de amplificarea acestui proces de radiațiile ionizante (Wills şi Daves, 1972).

Peroxizii organici pot substitui NADPH şi O_2 în unele hidroxilări modificând biosinteza hepatică a unor compuşi cum ar fi acizii biliari. Modificări minore ale membranelor microzomiale, aşa cum se produc in intoxicări cronice cu solvenți organici sau metale grele, pot crea condiții pentru creşterea ponderii ramurii peroxidante a sistemului de transport electronic microzomial.

PEROXIDAREA LIPIDELOR CONSTITUIE UN PROCES FIRESC AL CĂRUI ROL CREŞTE ODATĂ CU CREŞTEREA CONCENTRAȚIEI TOXICILOR SAU MEDICAMENTELOR SUPUSE METABOLIZĂRII. DE ACEEA, ÎN PROCESUL DETOXIFIERII CREŞTE SEMNIFICATIV CONCENTRAȚIA LIPIDELOR PEROXIDATE (OLINESCU,1982).



SCHEMA PROBABILĂ A HIDROXILĂRII DATORITĂ CAPACITĂȚII PEROXIDAZICE A CITOCROMILOR P_{450} ŞI B_5

In cazul metabolizării otrăvurilor şi, în general, a substanțelor exogene, are loc peroxidarea lipidelor. Cel puțin în ficat, aceasta reprezintă un fenomen fiziologic controlat de sistemele protectoare, care în anumite limite nu duce la pierderea de acizi graşi polinesaturați. Pe baza acestei observații, peroxidarea lipidelor în ficat ar fi un răspuns nespecific la o agresiune chimică, explicând astfel apariția peroxizilor lipidici şi a produşilor de descompunere (dialdehida malonică, etanul) în urma intoxicării cu substanțe cu cu caracter lipofil ce sunt metabolizate prin sistemul hidroxilant microzomal dependent de NADPH. Astfel, peroxizii lipidici şi produşii lor de descompunere au fost detectați în urma intoxicării cu CCl_4, etanol, bromtriclormetan sau paraquat. O dovadă suplimentară a implicării peroxidării în instalarea unei hepatotoxicități este efectul protector al glutationului, dietilditiocarbamatului şi cistaminei (Şerban şi colab., 1979), compuşi ce conțin grupări SH libere, cu acțiune antioxidantă. Pe de altă parte, în urma administrării unor substanțe hepatotoxice se observă scăderea conținutului de grupări SH.

Intoxicarea cu DDT (p,p'-diclordifeniltricloretan) şi alte insecticide clorurate înrudite produce o stimulare a enzimelor metabolizante din microzomi, la un nivel redus de absorbție. La o concentrație mai înaltă a toxicului, se instalează o intoxicație de tipul observat în cazul CCl_4 (Olinescu, 1982).

CONCENTRAȚII CRESCUTE DE PEROXIZI AI LIPIDELOR ÎN SÂNGE ŞI FICAT AU FOST GĂSITE DUPĂ IRADIEREA EXPERIMENTALĂ A ŞOBOLANILOR (OLINESCU ŞI COLAB., 1984).

REACȚIILE ENZIMATICE DE HIDROXILARE SUNT ÎN GENERAL DE FORMA :



$RH + O_2 + XH_2 \circledcirc ROH + H_2O + X$,

ÎN CARE RH REPREZINTĂ SUBSTRATUL, IAR XH_2 UN DONOR DE ELECTRONI, RESPECTIV $NADPH_2$ (VOICU, OLINESCU, 1977).

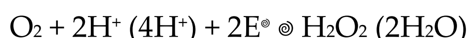
REDUCEREA ESTE REALIZATĂ DE REDUCTAZE (NITRO- ŞI AZO-) NADH- SAU NADPH- DEPENDENTE, MICROZOMIALE.

OXIDOREDUCERILE MICROZOMIALE SE REALIZEAZĂ SUB INFLUENȚA *DIOXIGENAZELOR*, CARE ÎNCORPOREAZĂ AMBII ATOMI DE OXIGEN ÎN SUBSTRAT,



O_2 + SUBSTRAT ◎ SUBSTRAT◎O_2

A *OXIGENAZELOR*, CARE REDUC O_2, FIE LA H_2O_2 SAU LA DOUĂ MOLECULE DE H_2O, FĂRĂ ÎNCORPORAREA O_2 ÎN SUBSTRAT:



$O_2 + 2H^+ (4H^+) + 2E^{◎}$ ◎ H_2O_2 ($2H_2O$)

SAU A *MONOOXIDAZELOR*, CARE ÎNCORPOREAZĂ UN ATOM DE OXIGEN ÎN SUBSTRAT ŞI REDUC CELĂLALT OXIGEN LA APĂ:



O_2 + SUBSTRAT + DONOR◎H_2 ◎ SUBSTRAT◎OH + H_2O + DONOR

HIDROLIZA ARE LOC SUB ACȚIUNEA ESTERAZELOR ŞI AMIDAZELOR MICROZOMIALE.

METABOLIZAREA NON-MICROZOMIALĂ INCLUDE, DE ASEMENEA, OXIDĂRI (OXIDAREA ALCOOLILOR PRIMARI, A ALDEHIDELOR ALIFATICE ŞI AROMATICE, DEZAMINAREA OXIDATIVĂ A AMINELOR AROMATICE ŞI ARIL-SUBSTITUITE), PRECUM ŞI REDUCERI (DISULFURI, N-OXIZI, S-OXIZI) ŞI HIDROLIZE (ESTERI, AMIDE), ÎNSĂ ENZIMELE SUNT LOCALIZATE ÎN MITOCONDRII, CITOPLASMĂ, PLASMĂ SANGVINĂ.

IMPLICAȚIILE TOXICOLOGICE ALE METABOLIZĂRII OTRĂVURILOR ŞI MEDICAMENTELOR ÎN FAZA I:

◎ METABOLIȚII SUNT MAI POLARI, DAR NU NEAPĂRAT MAI PUȚIN TOXICI ŞI NU SE POATE DEFINI BIOTRANSFORMAREA CA DETOXIFIERE;

◎ APARIȚIA METABOLIȚILOR MAI TOXICI EXPLICĂ FAPTUL CĂ UNELE XENOBIOTICE SUNT INACTIVE IN VITRO, DAR ACTIVE IN VIVO (PARATIONUL, SCHRADANUL, GLUCOZIZII CIANOGENETICI, CLORALHIDRATUL, FENACETINA, ETC.);

◎ APARIȚIA METABOLIȚILOR CU ACTIVITATE DIFERITĂ DE A COMPUSULUI INIȚIAL ESTE CARACTERISTICĂ UNOR XENOBIOTICE (EX. PRIMIDONA, TRECE PARȚIAL ÎN FENOBARBITAL CU PROPRIETĂȚI SEDATIVE, ALĂTURI DE CELE ANTICONVULSIVANTE);

◎ ACTIVAREA ENZIMELOR MICROZOMIALE, RESPECTIV INHIBAREA, SUB ACȚIUNEA XENOBIOTICELOR ADMINISTRATE CONCOMITENT SAU ANTERIOR DĂ NAŞTERE LA FENOMENUL DE INDUCȚIE, RESPECTIV DE *INHIBIȚIE* ENZIMATICĂ.

REACȚIILE DIN FAZA A II-A REPREZINTĂ CONJUGĂRI: GLUCURONOCONJUGAREA, SULFOCONJUGAREA, ACETILAREA, GLICOCOLCONJUGAREA, GLUTAMINCONJUGAREA, METILAREA, MERCAPTAREA ŞI SULFURIZAREA.

REACȚII DE CONJUGARE

REACȚIA	COMPUȘII INIȚIALI	COMPUȘII FINALI	EX.*)	ENZIMA	
GLUCURONO-CONJUGAREA	DERIVAȚI HIDROXILICI, TIOLICI, CARBOXILICI, AMINICI	O-GLUCONORIDE DE TIP ETER S-GLUCONORIDE DE TIP TIOETER O-GLUCONORIDE DE TIP ESTER N-GLUCONORIDE	6/1	GLUCONORIL-TRANSFERAZA	
SULFO-CONJUGAREA	DERIVAȚI HIDROXILICI, TIOLICI,	ESTERI SULFURICI, TIOSULFURICI,	6/2	SULFO-TRANSFERAZA	

	AMINICI	SULFAMAȚI			
TILAREA	AMINE AROMATICE, SULFONAMIDE, HIDRAZINE, ACID P-AMINOBENZOIC	DERIVAȚI N-ACETILAȚI	6/3	N-ACETIL-TRANSFERAZA	
COCOL-JUGAREA	DERIVAȚI CARBOXILICI (COOH FIXAT DIRECT PE CICLUL AROMATIC SAU PRIN INTERMEDIUL UNEI CATENE LATERALE)	DERIVAȚI AI ARIL-GLICOCOLULUI	6/4	GLICOCOL-N-ACILAZA	
JTAMIN-JUGAREA	UNII ACIZI ARIL-ACETICI	DERIVAȚI AI FENIL-ACETIL-GLUTAMINEI	6/5		
TILAREA	DERIVAȚI N-HETEROCICLICI, AMINE AROMATICE ENDOGENE, FENOLI, TIOLI, AS (SE, TE)	DERIVAȚI N, O, S-METILAȚI	6/6	METIL-TRANSFERAZA	
CAPTARE TEIN SAU TATION-JUGARE)	HIDROCARBURI AROMATICE, DERIVAȚI HALOGENAȚI AROMATICI	ACIZI ARIL-MERCAPTURICI	6/7	CISTEIN-(GLUTATION)-TRANSFERAZA	
URIZARE	ACID CIANHIDRIC, CIANURI, NITRILI	SULFOCIANURI (TIOCIANAȚI)	6/8	RODANAZA (TIOSULFAT: CIANURI-SULF-TRANSFERAZA	

*) EXEMPLE ÎN TABELUL URMĂTOR; ** ACTIVARE CU

UNA DINTRE CELE MAI IMPORTANTE REACȚII ESTE GLUCURONOCONJUGAREA, DEOARECE ACIDUL GLUCURONIC, GLUCURONIL-TRANSFERAZA ŞI NUCLEOTIDUL DE ACTIVARE SE GĂSESC ÎN MAJORITATEA ȚESUTURILOR (FICAT, RINICHI, INTESTIN) ŞI, DE ASEMENEA, DATORITĂ VARIETĂȚII DE GRUPĂRI (-OH, -SH, -NH_2) PE CARE ACIDUL GLUCURONIC POATE FI TRANSFERAT. GLUCURONIL-TRANSFERAZA ESTE LOCALIZATĂ ÎN MICROZOMI. SULFOCONJUGAREA SE REALIZEAZĂ ASUPRA ACELORAŞI GRUPĂRI CA GLUCURONOCONJUGAREA, PRIN TRANSFERUL SULFATULUI PROVENIT ÎN SPECIAL DIN AMINOACIZI SULFURAȚI.

SULFTRANSFERAZA SE GĂSEŞTE ÎN CITOPLASMĂ, ÎNDEOSEBI ÎN FICAT ŞI INTESTIN. ACETILAREA ARE LOC ÎN FICAT ŞI ÎN CELULELE SISTEMULUI RETICULO-ENDOTELIAL. CONJUGAREA CU GLICOCOLUL SE REALIZEAZĂ ÎN FICAT. METILAREA, CU SEDIUL ÎN FICAT ŞI RINICHI, SPOLIAZĂ ORGANISMUL DE GRUPĂRI METIL PROCURATE DE LA METIONINĂ ŞI DE LA BAZELE XANTINICE. MERCAPTAREA ARE SEDIUL ÎN RINICHI, IAR METABOLIȚII REZULTAȚI SUNT UNEORI MAI TOXICI, ÎNSĂ MAI RAPID DE ELIMINAT. SULFURIZAREA REPREZINTĂ O REALĂ DETOXIFIERE, DEOARECE TOXICITATEA SULFOCIANURII FAȚĂ DE CIANURĂ ESTE FOARTE SLABĂ, ÎNSĂ EFICIENȚA REACȚIEI ESTE REDUSĂ, DIN CAUZA CANTITĂȚILOR LIMITATE DE RODANAZĂ DISPONIBILĂ.

CONJUGAREA ARE LOC CU CONSUM DE ENERGIE, DE ACEEA ESTE NECESARĂ O ACTIVARE PREALABILĂ. ACESTE REACȚII PRESUPUN FIE ACTIVAREA AGENTULUI DE CONJUGARE, FIE ACTIVAREA TOXICULUI.

ÎN URMA REACȚIILOR DE CONJUGARE REZULTĂ COMPUŞI HIDROSOLUBILI, MAI PUȚIN TOXICI DECÂT METABOLITUL DIN PRIMA FAZĂ. ASTFEL, BENZENUL, SE TRANSFORMĂ ÎN PRIMA FAZĂ ÎN FENOL, TOXIC, IAR ACESTA, ÎN FAZA A DOUA TRECE ÎN ACID FENILGLUCURONIC, MAI PUȚIN TOXIC ŞI MAI HIDROSOLUBIL.

UN NUMĂR MIC DE XENOBIOTICE POT LUA PARTE LA REACȚII DE SINTEZĂ DENUMITE "SINTEZE LETALE" DIN CARE REZULTĂ COMPUŞI TOXICI.

BIOTRANSFORMAREA ESTE INFLUENȚATĂ DE FACTORI ENDOGENI ŞI EXOGENI: SPECIE, RASĂ, VÂRSTĂ, SEX, STĂRI PATOLOGICE, STAREA DE NUTRIȚIE, BIORITMUL, FACTORII DE MEDIU, INTERACȚIUNILE CU ALTE XENOBIOTICE SAU CU FACTORII NUTRITIVI.

BIOTRANSFORMAREA REPREZINTĂ CALEA MAJORĂ DE DEBARASARE A ORGANISMULUI DE TOXICI. SISTEMELE ENZIMATICE POT FI ÎNSĂ DEPĂŞITE, AVÂND DREPT CONSECINȚĂ SPOLIEREA ORGANISMULUI ÎN GRUPĂRI ACETIL, METIL, SULFAT, TIOL, ETC.

NECESARE REACȚIILOR DIN FAZA A II-A; CREŞTEREA CERINȚEI DE NADPH IMPLICAT ÎN OFMM, CU CONSECINȚE NEFAVORABILE ASUPRA UNOR METABOLISME.

ELIMINAREA TOXICILOR DIN CORP

NOCIVITATEA UNUI TOXIC ESTE CU ATÂT MAI MARE CU CÂT ELIMINAREA SA ESTE MAI LENTĂ. IN PRINCIPAL, ELIMINAREA SE REALIZEAZĂ PE CALE RENALĂ, DIGESTIVĂ, PULMONARĂ ŞI TRANSCUTANATĂ.

CALEA RENALĂ ESTE CEA MAI IMPORTANTĂ MODALITATE DE ELIMINARE A TOXICILOR DIN CORP. PE ACEASTĂ CALE SE ELIMINĂ TOXICII CU MASE MOLECULARE SUB 400.

ELIMINAREA RENALĂ SE REALIZEAZĂ PRIN TREI MECANISME: FILTRAREA GLOMERULARĂ, SECREȚIA ACTIVĂ ŞI REABSORBȚIA TUBULARĂ. VITEZA ELIMINĂRII DEPINDE DE:

◎ DEBITUL URINAR, DEPENDENT DE PARAMETRII INTERNI ŞI EXTERNI;

◎ RATA DE FIXARE A PROTEINELOR PLASMATICE (LEGAREA ÎNTR-UN PROCENT MAI RIDICAT A TOXICULUI CONDUCE LA ELIMINAREA SA MAI LENTĂ);

◎ PH-UL URINAR: O PARTE DIN TOXICUL FILTRAT GLOMERULAR POATE FI REABSORBITĂ TUBULAR, ÎN FUNCȚIE DE CARACTERISTICILE FIZICO-CHIMICE. COMPUŞII LIPOSOLUBILI SE REABSORB PÂNĂ LA METABOLIZARE COMPLETĂ ÎN COMPUŞI HIDROSOLUBILI, ELIMINABILI RENAL; ELECTROLIȚII SLABI SE ELIMINĂ ÎN RAPORT CU PH-UL URINEI TUBULARE (PH-UL ALCALIN FAVORIZEAZĂ ELIMINAREA COMPUSULUI ACID IONIZAT, DEOARECE REABSORBȚIA TUBULARĂ ESTE ÎMPIEDICATĂ, IAR PH-UL ACID FAVORIZEAZĂ ELIMINAREA COMPUSULUI BAZIC); ELECTROLIȚII

TARI SE ELIMINĂ RAPID, INDIFERENT DE PH-UL URINAR DEOARECE SUNT COMPLET DISOCIAȚI.

◎ INDUCȚIA (SAU INHIBIȚIA) ENZIMATICĂ MODIFICĂ RITMUL EXCREȚIEI;

◎ VÂRSTA ŞI INTEGRITATEA FUNCȚIEI RENALE: LA VÂRSTNICI ŞI TARAȚI RENAL ELIMINAREA TOXICULUI ESTE REDUSĂ;

◎ INTERACȚIUNI: TOXICII CARE SE ELIMINĂ PRIN SECREȚIA ACTIVĂ TUBULARĂ POT INTRA ÎN COMPETIȚIE PENTRU MECANISMELE DE TRANSPORT.

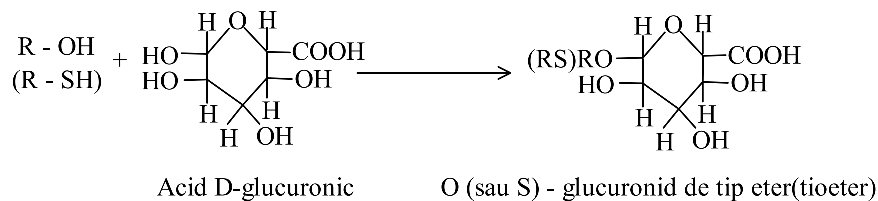
CALEA DIGESTIVĂ (PRIN SUCURI DIGESTIVE ŞI BILĂ) ESTE CARACTERISTICĂ PENTRU TOXICII CU MASE MOLECULARE DE 400-500. ROLUL FICATULUI ESTE IMPORTANT ÎN ELIMINAREA TOXICILOR DIN ORGANISM, DAR EFECTUL SĂU ESTE CONTRACARAT DE REABSORBȚIA TOXICULUI DE INTESTIN PRIN CIRCUITUL ENTEROHEPATIC. DE ACEEA, SE ELIMINĂ PRIN TUBUL DIGESTIV (FECALE) ACEI TOXICI CARE SUNT CONCENTRAȚI ÎN BILĂ, DAR NU SUNT REABSORBIȚI DIN INTESTIN.

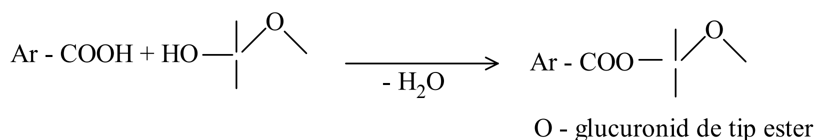
CALEA PULMONARĂ ESTE CARACTERISTICĂ GAZELOR ŞI SUBSTANȚELOR VOLATILE CARE STRĂBAT MEMBRANA ALVEOLOCAPILARĂ ŞI, AJUNGÂND LA ALVEOLE, SUNT EVACUATE PRIN EXPIRAȚIE.

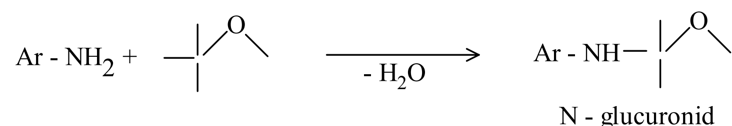
ALTE CĂI DE ELIMINARE: PRIN TEGUMENTE, FANERE, GLANDE SUDORIPARE SE ELIMINĂ METALE GRELE, ARSEN, HALOGENURI, UNELE SUBSTANȚE VOLATILE; PRIN GLANDA MAMARĂ SE ELIMINĂ O SERIE DE MEDICAMENTE ŞI TOXICI.

REACȚII DE CONJUGARE

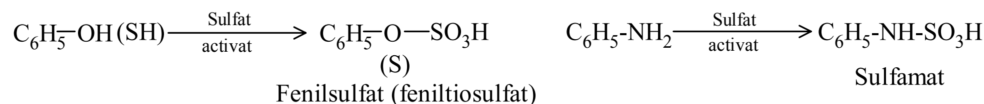
1. Glucuronoconjugarea:



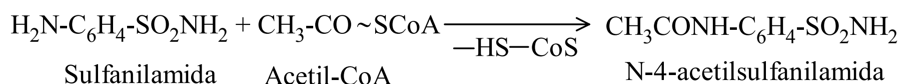




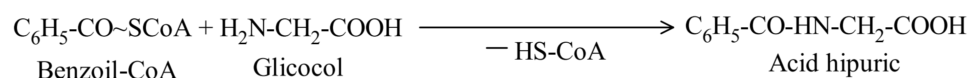
2. Sulfoconjugarea:



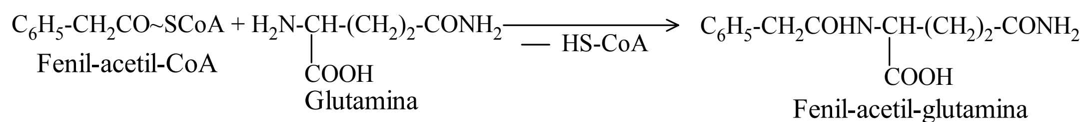
3. Acetilarea



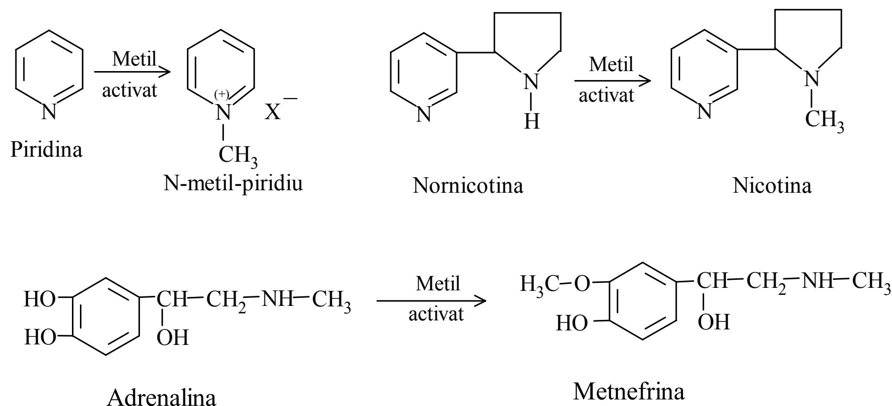
4. Glicocolconjugarea:

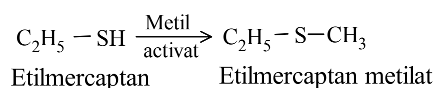


5.Glutamincojugarea:

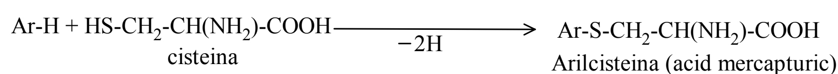


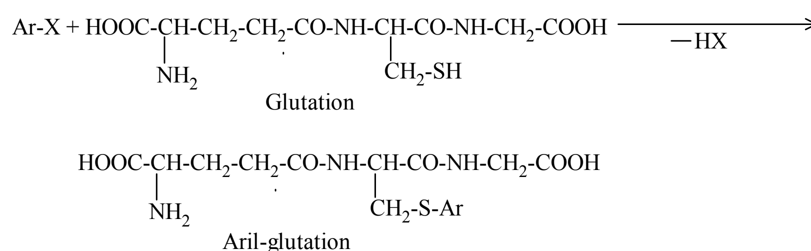
6. Metilarea:



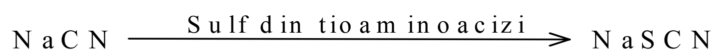


7. Mercaptarea:





8. Sulfurizarea:



CAP. VII ACȚIUNEA TOXICILOR ASUPRA ORGANISMULUI:TOXICODINAMIA

EFECTELE NOCIVE ALE TOXICILOR SE RESIMT LA NIVEL DE ȚESUT, ORGAN, APARAT ŞI SISTEM. TOTALITATEA PROCESELOR BIOCHIMICE ŞI FIZICO-CHIMICE CARE AU LOC ÎN CADRUL INTERACȚIUNII TOXIC-ORGANISM CONSTITUIE ACȚIUNEA TOXICODINAMICĂ.

TOXICII PROVOACĂ MODIFICĂRI RAPIDE ŞI ADESEA REVERSIBILE CARE AU LOC LA NIVEL CELULAR ŞI SUBCELULAR, OBSERVABILE PRIN MICROSCOPIE OPTICĂ ŞI ELECTRONICĂ. MODIFICĂRILE PATOLOGICE DIN ȚESUTURI SUNT PRECEDATE DE MODIFICĂRI ÎN BIOCHIMIA LOR.

ÎN TOATE LEZIUNILE BIOCHIMICE, LA BAZA PROCESULUI SE AFLĂ (ŞI) O REACȚIE MOLECULARĂ. INTERACȚIUNEA TOXIC-ORGANISM A FOST EXPLICATĂ PRIN IMPACTUL ÎNTRE TOXIC ŞI/SAU METABOLIȚI ŞI ANUMITE MOLECULE ALE ORGANISMULUI. SITUSUL PRIMAR DE ACȚIUNE TOXICĂ S-AR AFLA AŞADAR LA NIVEL MOLECULAR. MAI MULT, NUMAI ANUMITE GRUPĂRI DIN MOLECULĂ (-COOH, $-NH_2$, -OH, -SH) AR FI REACTIVE, IAR RESTUL MOLECULEI DOAR “MODULEAZĂ” REACȚIA, ÎNCÂT MAJORITATEA REACȚIILOR AU LOC LA NIVEL SUBMOLECULAR.

1. ACȚIUNEA TOXICILOR LA NIVEL DE ȚESUT, ORGAN, APARAT, SISTEM

SISTEMUL NERVOS POATE FI AFECTAT DE TOXICI ÎN TOATE SECTOARELE SALE: CENTRAL, PERIFERIC, VEGETATIV, PRIN ACȚIUNE DIRECTĂ (LA NIVELUL CENTRILOR NERVOŞI, AL SISTEMELOR

NEUROEFECTOARE ŞI AL SISTEMELOR AFERENTE NEUROACCEPTOARE) ŞI INDIRECTĂ (CA URMARE A HIPOXIEI, HIPERCAPNIEI, MODIFICĂRILOR HIDROELECTROLITICE ŞI ACIDOBAZICE, COLAPSULUI VASCULAR). PRINCIPALELE TULBURĂRI NEUROLOGICE ŞI PSIHICE DIN INTOXICAȚIILE ACUTE SUNT:

◎ COMA TOXICĂ APARE ÎN INTOXICAȚIILE ACUTE, ÎN SPECIAL MEDICAMENTOASE ŞI PREZINTĂ VARIAȚII SIMPTOMATICE ÎN FUNCȚIE DE TOXIC;

◎ CONVULSIILE SUNT CONSECINȚA HIPEREXCITABILITĂȚII ZONELOR MOTORII DIN SCOARȚĂ SAU A UNOR CENTRI NERVOŞI MOTORI ŞI MEDULARI;

◎ TULBURĂRILE MOTORII (PAREZE, PARALIZII) ŞI SENZITIVE (NEUROMIALGII, ANESTEZII, PARESTEZII) AU DIFERITE SUBSTRATURI;

◎ MIDRIAZA, MIOZA, RIGIDITATEA PUPILARĂ POT APĂREA DIRECT, GENERATE DE TOXICPRIN STIMULENȚI VEGETATIVI, CA ŞI PRIN BLOCAREA SISTEMELOR ENZIMATICE VEGETATIVE SAU PRIN STĂRI HIPOXICE;

◎ DELIRUL, CU SAU FĂRĂ HALUCINAȚII, APARE ÎN INTOXICAȚII ACUTE CU FEBRĂ SAU CU INSUFICIENȚĂ RENALĂ ACUTĂ, CU TULBURĂRI CIRCULATORII ŞI ANEMIE GRAVĂ;

◎ CEFALEEA, INSOMNIA, SOMNOLENȚA, APATIA, ANXIETATEA, IRITABILITATEA SUNT TULBURĂRI NEUROPSIHICE.

LEZIUNILE HISTOPATOLOGICE LA NIVELUL SISTEMULUI NERVOS CENTRAL ÎMBRACĂ DIFERITE FORME, ÎN RAPORT CU SPECIFICUL TOXICULUI. ÎN INTOXICAȚIILE ACUTE ŞI ÎN UNELE CRONICE (EX. SATURNISM) SE OBSERVĂ DEGENERESCENȚĂ MIELINICĂ A NERVILOR PERIFERICI.

SISTEMUL CARDIOVASCULAR ESTE AFECTAT DE TOXICI, DIRECT SAU INDIRECT, PRIN ACȚIUNE ASUPRA PRINCIPALELOR VERIGI ALE CIRCULAȚIEI: CONTRACTIBILITATEA MIOCARDULUI, FRECVENȚA CARDIACĂ, VOLUMUL SANGVIN CIRCULANT, VASOMOTRICITATEA.

◎ TULBURĂRILE DE CONTRACTIBILITATE SURVIN PRIN ACȚIUNE DIRECTĂ ASUPRA MIOCARDULUI SAU PRINTR-UN REGIM CIRCULATOR CORONARIAN INADECVAT SAU CA URMARE A HIPOXIEI;

◎ TULBURĂRILE DE RITM APAR PRIN ACȚIUNE ASUPRA SISTEMULUI NERVOS PERIFERIC, CA ŞI ASUPRA FASCICULELOR EXCITOCONDUCĂTOARE ALE MIOCARDULUI;

◎ SCĂDEREA VOLUMULUI SANGVIN CIRCULANT ARE LOC, ÎN PRINCIPAL, PRIN CREŞTEREA PERMEABILITĂȚII CAPILARE CU EXTRAVAZARE DE PLASMĂ ÎN ȚESUTURI, CAVITĂȚI SEROASE, LUMEN GASTROINTESTINAL;

◎ ALTERĂRILE VASOMOTRICITĂȚII SUNT VASODILATAȚIA (PRIN DEPRIMAREA SNC) ŞI VASOCONSTRICȚIA.

DINTRE MANIFESTĂRILE CLINICE ALE TULBURĂRILOR CARDIOVASCULARE DIN INTOXICAȚIILE ACUTE, INSUFICIENȚA CIRCULATORIE ACUTĂ PERIFERICĂ (ŞOCUL TOXIC SAU COLAPSUL TOXIC) ŞI STOPUL CARDIAC SUNT MODALITĂȚILE CELE MAI FRECVENTE DE LETALITATE.

APARATUL RESPIRATOR POATE FI AFECTAT PE URMĂTOARELE CĂI:

◎ INFLAMAȚIA ACUTĂ A MUCOASEI TRACTULUI RESPIRATOR CARE POATE CONDUCE LA ASFIXIE, PRIN LIPSĂ DE AER;

◎ ALTERAREA PERMEABILITĂȚII MEMBRANEI ALVEOLOCAPILARE, URMATĂ, IMEDIAT SAU TARDIV, DE EDEM PULMONAR ACUT TOXIC;

◎ EXCITAREA SAU DEPRIMAREA CENTRILOR RESPIRATORI POATE CONDUCE LA STOP RESPIRATOR;

◎ BLOCAREA HEMOGLOBINEI CIRCULANTE (CAZUL CO) SAU A RESPIRAȚIEI CELULARE (CAZUL $CN^{◎}$) CONDUCE LA ASFIXIE PRIN

INCAPACITATEA DE FIXARE A OXIGENULUI PE HEMOGLOBINĂ, RESPECTIV PRIN ANOXIE TISULARĂ;

◎ PARALIZIA MUŞCHILOR RESPIRATORI DETERMINĂ ASFIXIE.

FICATUL POATE FI LEZAT PRIN ACȚIUNE TOXICĂ DIRECTĂ ASUPRA HEPATOCITULUI SAU PRIN ACȚIUNE TROFOPATICĂ, CÂND SE PRODUCE CARENȚA ÎN UNII FACTORI INDISPENSABILI HEPATOCITULUI. SE POT PRODUCE HEPATOPATII ŞI PRIN HIPERSENSIBILITATE INDIVIDUALĂ SAU PRIN IMATURITATE HEPATICĂ (PERIOADA NEONATALĂ) SAU PRIN DEFICIT ENZIMATIC. TOATE FORMELE DE HEPATOPATII IMPLICĂ SCĂDEREA CIRCULAȚIEI INTRAHEPATICE.

TOXICII LIPOSOLUBILI AFECTEAZĂ PREDOMINANT HEPATOCITELE, IAR TOXICII HIDROSOLUBILI, CELULELE TUBULORENALE.

LEZIUNILE HEPATICE INTERESEAZĂ ATÂT PARENCHIMUL (HEPATOCITELE), CÂT ŞI MEZENCHIMUL. INIȚIAL SE PRODUCE DEGENERESCENȚA HEPATOCITELOR, URMATĂ DE INFLAMAREA MEZENCHIMULUI. ACEASTA DIN URMĂ NU ARE LOC DACĂ LEZAREA HEPATOCITELOR ESTE FIE UŞOARĂ ŞI REVERSIBILĂ, FIE MASIVĂ, CU EVOLUȚIE RAPID FATALĂ. LEZIUNILE PARENCHIMATOASE SUNT DE TIP NECROZĂ, STEATOZĂ (ÎNCĂRCARE GRASĂ) ŞI COLESTAZĂ, IAR LEZIUNEA MEZENCHIMULUI CONSTĂ ÎN SCLEROZĂ.

ÎN FUNCȚIE DE DURATA ŞI INTENSITATEA EXPUNERII LA TOXIC, PRECUM ŞI CU SENSIBILITATEA INDIVIDUALĂ, AFECTAREA FICATULUI SE EXPRIMĂ PRIN: ATROFIE GALBENĂ ACUTĂ (HEPATONECROZĂ ÎNTINSĂ, IREVERSIBILĂ), HEPATITĂ ACUTĂ (HEPATONECROZĂ LIMITATĂ CU REGENERARE ÎN TIMP), HEPATITĂ SUBACUTĂ SAU CRONICĂ (HEPATONECROZĂ PROGRESIVĂ, CU REPARAȚIE MEZENCHIMALĂ), CIROZĂ (SCLEROZĂ ÎNTINSĂ, CU SFÂRŞIT LETAL).

RINICHIUL ESTE AFECTAT DE ACEI TOXICI ŞI/SAU METABOLIȚI CARE SE ELIMINĂ ÎN PRINCIPAL LA ACEST NIVEL. LEZAREA SE

PRODUCE PRIN MECANISM DIRECT SAU ALERGIC SAU CA O CONSECINȚĂ A HIPOXIEI DIN STAREA DE ŞOC:

◎ NEFROPATIA ACUTĂ TUBULARĂ TOXICĂ SE PRODUCE PRIN ACȚIUNEA NEFROTOXICĂ DIRECTĂ. PORȚIUNEA CEA MAI SENSIBILĂ ESTE TUBUL CONTORT PROXIMAL – UNDE AU LOC CONCENTRAREA ŞI REABSORBȚIA – AFECTAREA EXPRIMÂNDU-SE PRIN PROCESE DEGENERATIVE DE DIFERITE GRADE. LEZIUNILE NEFROTICE SE ÎNSOȚESC, CÂND INTOXICAȚIA ESTE GRAVĂ, DE LEZIUNI DETERMINATE DE ISCHEMIE (DEFICIT CIRCULATOR LOCAL). TABLOUL CLINIC ESTE DE INSUFICIENȚĂ RENALĂ ACUTĂ TOXICĂ;

◎ RINICHIUL ÎN STARE DE ŞOC ESTE CONSECINȚA ACȚIUNII TOXICE INDIRECTE, CÂND ÎN CADRUL ŞOCULUI TOXIC, ALĂTURI DE ALTE ORGANE ŞI SISTEME, ESTE AFECTAT ŞI RINICHIUL, DATORITĂ ANOXIEI ISCHEMICE, CU INSTALAREA OLIGURIEI (ANURIEI). DACĂ ISCHEMIA ESTE PRELUNGITĂ, DIUREZA NU ESTE RELUATĂ DUPĂ ÎNLĂTURAREA STĂRII DE ŞOC A INTOXICATULUI ŞI APARE SINDROMUL DE INSUFICIENȚĂ RENALĂ ACUTĂ TOXICĂ;

◎ NEFROPATIA CRONICĂ, PROFESIONALĂ SAU MEDICAMENTOASĂ, POATE FI PRIMAR SAU SECUNDAR CRONICĂ CÂND REZULTĂ DIN EVOLUȚIA UNEI NEFROPATII ACUTE.

APARATUL DIGESTIV ESTE AFECTAT DE MAJORITATEA TOXICILOR INTRODUŞI PE CALE ORALĂ. ACEŞTIA ACȚIONEAZĂ FIE DIRECT PE DIFERITE STRUCTURI, FIE INDIRECT, PRIN INTERMEDIUL SISTEMULUI NERVOS CENTRAL SAU VEGETATIV SAU AL UNOR REACȚII IMUNOALERGICE. LEZIUNILE ORGANICE SAU FUNCȚIONALE SUNT EXPRIMATE PRIN DIFERITE MANIFESTĂRI.

SÂNGELE ŞI MĂDUVA HEMATOGENĂ POT FI ATACATE DE TOXICI CARE PROVOACĂ HEMOPATII INDUSE PRIN ATACAREA MĂDUVEI HEMATOGENE (HEMOPATII MIELOTOXICE SAU IMUNOPATOGENE), HEMOPATII INDUSE PRIN ATACAREA ELEMENTELOR SÂNGELUI CIRCULANT, HEMOPATII INDUSE PRIN COMBINAREA AMBELOR MECANISME, ACȚIUNEA PREVALÂND FIE PE MĂDUVĂ, FIE PE ELEMENTELE SÂNGELUI.

TULBURĂRILE HIDROELECTROLITICE ŞI DE ECHILIBRU ACIDO-BAZIC POT FI DEOSEBIT DE GRAVE ÎN INTOXICAȚIILE SEVERE ŞI SE REALIZEAZĂ PRIN URMĂTOARELE MECANISME: VĂRSĂTURI ŞI DIAREE; HIPERSUDORAȚIE ŞI HIPERSECREȚIE GLADNULARĂ; SCĂDEREA (ABOLIREA) FUNCȚIEI RENALE; ÎNTRERUPEREA APORTULUI ORAL SAU APORT EXAGERAT PARENTERAL; FORMAREA DE EXCES DE ACIZI PRIN METABOLIZAREA TOXICULUI; APORT DE ACIZI ŞI BAZE EXOGENE (INTOXICAȚII ACUTE CU ACIZI ŞI BAZE, UNDE CREŞTE SAU SCADE PH-UL SANGVIN).

ACȚIUNEA TOXICĂ DIRECTĂ ESTE CARACTERISTICĂ UNUI NUMĂR LIMITAT DE TOXICI CARE DETERMINĂ INFLAMAȚIA SAU NECROZA ȚESUTULUI CU CARE VIN ÎN CONTACT: TEGUMENTELE (SUBSTANȚE VEZICANTE, ACIZI ŞI BAZE TARI), CONJUNCTIVELE BULBARE (SUBSTANȚE LACRIMOGENE), MUCOASELE TRACTULUI RESPIRATOR (GAZE IRITANTE), MUCOASELE BUCALĂ, ESOFAGIANĂ ŞI GASTRICĂ (SUBSTANȚE IRITANTE, CAUSTICE, COROZIVE ETC.).

2. ACȚIUNEA TOXICILOR LA NIVEL CELULAR

MEMBRANA CELULARĂ (FIG. 2) REGLEAZĂ PĂTRUNDEREA ŞI ELIMINAREA SUBSTANȚELOR SPRE INTERIOR ŞI SPRE EXTERIOR, MENȚINÂND CONSTANTĂ COMPOZIȚIA MEDIULUI INTERN. TOXICUL POATE INFLUENȚA FLUXUL IONIC PRIN MEMBRANĂ PRIN MICŞORAREA CANALELOR IONICE, CÂND SE PRODUCE STABILIZAREA MEMBRANEI ŞI BLOCAREA CONDUCERII NERVOASE PRIN ÎNTRERUPEREA FLUXULUI IONIC (CAZUL COCAINEI). DEOARECE EXISTĂ CANALE SEPARATE PENTRU NA^{+} ŞI PENTRU K^{+}, UNII TOXICI(TETRODOXINA) BLOCHEAZĂ FLUXUL DE SODIU, ALȚII (CLORURA DE TETRAETILAMONIU), FLUXUL DE POTASIU;

DE ASEMENEA, UNII TOXICI (DDT, ALCALOIZII DIN VERATRUM) FAVORIZEAZĂ LĂRGIREA CANALELOR IONICE, CÂND SE PRODUCE LABILIZAREA MEMBRANEI. TOTODATĂ, PRINTR-O ACȚIUNE ANTI-

ATP-AZICĂ (OUABAINĂ) SE PRODUCE INHIBAREA POMPEI CATIONICE.

NUCLEUL ESTE AFECTAT DE TOXICI PRIN:

◎ INHIBAREA PRECURSORILOR ACIZILOR NUCLEICI;

◎ ÎNCORPORAREA ÎN ACIZII NUCLEICI;

◎ LEGAREA COVALENTĂ CU ACIZII NUCLEICI;

◎ FORMAREA COMPLECŞILOR REVERSIBILI CU ADN;

◎ INTERFERAREA CU ADN- ŞI ARN-POLIMERAZA.

INHIBAREA PRECURSORILOR ACIZILOR NUCLEICI ESTE REALIZATĂ DE ANTAGONIŞTII ACIDULUI FOLIC ŞI DE ANTIMETABOLIȚII BAZELOR PURINICE (ADENINA, GUANINA, HIPOXANTINA, XANTINA) SAU PIRIMIDINICE (URACILUL, CITOZINA, TIMINA), CARE, DEŞI ANALOGI CHIMICI AI ACESTOR BAZE, FORMEAZĂ COMPUŞI INUTILIZABILI DE CĂTRE CELULĂ . ASTFEL, 6-TIOPURINA, ANALOG CHIMIC AL HIPOXANTINEI, ÎMPIEDICĂ INTRAREA ACESTEIA ÎN CELULĂ, DEOARECE HIPOXANTINA FORMEAZĂ ACID INOZINIC, ÎN TIMP CE 6-TIOPURINA SINTETIZEAZĂ ACID TIOINOZINIC, RESPINS DE CELULĂ. ASEMĂNĂTOR REACȚIONEAZĂ ŞI 5-FLUOROURACILUL, ANALOG CHIMIC AL URACILULUI.

6-TIOGUANINA, INHIBĂ BIOSINTEZA ACIZILOR NUCLEICI, DAR SE POATE ÎNCORPORA ÎN ACEŞTIA ÎN LOCUL BAZELOR NATURALE.

LEGĂTURA COVALENTĂ CU ACIZII NUCLEICI SE REFERĂ LA SUBSTANȚELE ANTITUMORALE ŞI LA CANCERIGENI.

COMPLECŞI REVERSIBILI CU ADN POT FORMA LSD ŞI UNELE ANTIBIOTICE (ANTRACILINA, RUBIDOMICINA) CARE AFECTEAZĂ REPLICAREA ŞI TRANSCRIEREA; LEGĂTURILE FIIND ELECTROSTATICE, MODIFICAREA PH-ULUI MEDIULUI DETERMINĂ DESFACEREA COMPLECŞILOR.

INTERFERENȚA CU ADN- ŞI ARN-POLIMERAZA ESTE CAZUL SARCOMICINEI CARE INHIBĂ ADN-POLIMERAZA, BLOCÂNDU-I GRUPĂRILE –SH, SAU AL RIFAMICINEI ŞI RIFAMPICINEI, CARE INHIBĂ ARN-POLIMERAZA LA MICROORGANISME –NU ÎNSĂ LA MAMIFERE – FAPT PE CARE SE BAZEAZĂ UTILIZAREA LOR CLINICĂ.

MITOCONDRIILE SUNT SEDIUL LANȚULUI RESPIRATOR (TRANSPORTOR DE ELECTRONI) ŞI AL CUPLĂRII ACESTUI PROCES CU FOSFORILAREA OXIDATIVĂ, AVÂND CA REZULTAT SINTEZA DE ATP. TRANSPORTUL ELECTRONILOR ESTE DE ASEMENEA CUPLAT CU CICLUL KREBS. ACȚIUNEA TOXICILOR POATE AVEA LOC LA URMĂTOARELE NIVELE:

◎ CICLUL KREBS ESTE BLOCAT DE DIFERIȚI TOXICI (INHIBITORI) LA ORICARE DIN SECVENȚELE SALE; ASTFEL, ACIDUL FLUORACETIC REALIZEAZĂ "SINTEZA LETALĂ" UNELE FENOTIAZINE INHIBĂ DEHIDROGENAZELE NAD-DEPENDENTE, CU OPRIREA CICLULUI LA NIVELELE RESPECTIVE;

◎ LANȚUL RESPIRATOR ESTE BLOCAT PRIN INHIBAREA FLAVINNUCLEOTIDELOR (BARBITURICE, UNELE FENOTIAZINE), A CITOCROMILOR ($CN^{\circledcirc}$, H_2S, ACTINOMICINĂ), A ENZIMEI Q (DICUMARINICE) ETC.;

◎ SINTEZA ATP ESTE MICŞORATĂ DE UNELE XENOBIOTICE (CCL_4, TETRACICLINE, DIGITALICE); ALȚI TOXICI ÎMPIEDICĂ FOSFORILAREA OXIDATIVĂ PRIN ACȚIUNE MIXTĂ ASUPRA LANȚULUI RESPIRATOR ŞI A SINTEZEI ATP; DECUPLAREA TRANSPORTULUI DE ELECTRONI CU FOSFORILAREA OXIDATIVĂ ESTE MODUL DE ACȚIUNE AL DINITROFENOLILOR;

◎ MODIFICAREA PERMEABILITĂȚII MEMBRANEI MITOCONDRIALE ARE LOC PRIN DIFERITE MECANISME (DE PILDĂ, PRIN INTERACȚIUNE CU –SH);

◎ INFLUENȚA SINTEZEI PROTEINELOR MITOCONDRIALE ARE LOC PRIN INHIBARE (ACTINOMICINA D BLOCHEAZĂ ARN-

POLIMERAZA) SAU PRIN ACTIVARE (HORMONUL TIROIDIAN STIMULEAZĂ CAPTAREA UNOR AMINOACIZI).

RETICULUL ENDOPLASMATIC ESTE FORMAT DIN MEMBRANE DE SEPARARE ARANJATE ÎNTR-UN SISTEM DE CANALICULE CARE ATING NUCLEUL ŞI ÎNCONJOARĂ MITOCONDRIILE. UNELE PORȚIUNI ALE RETICULUI ENDOPLASMATIC SUNT NETEDE (REN), ÎN TIMP CE ALTELE POARTĂ GRANULE DE RIBOZOMI (RETICUL ENDOPLASMATIC RUGOS, RER). RETICULUL ENDOPLASMATIC ARE ROLUL DE A CONCENTRA ŞI TRANSPORTA PROTEINELE SINTETIZATE DE RIBOZOMI. PRIN CENTRIFUGARE DIFERENȚIATĂ SE OBȚIN FRAGMENTE DE RER BOGATE ÎN FOSFOLIPIDE ŞI ÎN RIBOZOMI, ŞI DE REN, DENUMITE MICROZOMI, ÎN CARE SE GĂSEŞTE MANJORITATEA OFMM. PRINCIPALELE MECANISME DE ACȚIUNE A TOXICILOR ASUPRA RETICULULUI ENDOPLASMATIC SUNT:

◎ MODIFICAREA STRUCTURII RETICULULUI PRIN SCĂDEREA SINTEZEI LIPOPROTEINELOR, CONSECINȚĂ A SCĂDERII SINTEZEI ATP ÎN MITOCONDRII. ASTFEL, TETRACICLINELE DETERMINĂ STEATOZĂ HEPATICĂ CU VACUOLIZAREA RETICULULUI ENDOPLASMATIC ŞI CREŞTEREA CANTITĂȚII DE MEMBRANE NETEDE (REN), CONCOMITENT CU SCĂDEREA CANTITĂȚII DE MEMBRANE RUGOASE (RER). TETRACLORURA DE CARBON DETERMINĂ DILATAREA RER CU DESPRINDEREA RIBOZOMILOR ŞI SCĂDEREA SINTEZEI PROTEICE;

◎ HIPERTROFIA RETICULULUI PRIN STIMULAREA ACTIVITĂȚII OFMM CA URMARE A INDUCȚIEI ENZIMATICE;

◎ INHIBIȚIA DIRECTĂ A ENZIMELOR (NOVOBIOCINA INHIBĂ GLUCURONIL-TRANSFERAZA HEPATICĂ, CU ELIBERARE DE BILIRUBINĂ ŞI APARIȚIA HEPATITEI TOXICE);

RIBOZOMII SUNT GRANULELE DISPUSE DE-A LUNGUL RETICULULUI ENDOPLASMATIC ŞI REPREZINTĂ LOCUL DE SINTEZĂ A PROTEINELOR DUPĂ MODELUL DAT DE ARN-MESAGER. SINTEZA PROTEICĂ POATE FI AFECTATĂ DE UNII TOXICI. ASTFEL, PUROTONINA, UN ANTITUMORAL ASEMĂNĂTOR STRUCTURAL CU PORȚIUNEA DIN ARN DE TRANSFER (T-ARN) LA CARE SE FIXEAZĂ

AMINOACIZII ACTIVAȚI (AMINOACIL-T-ARN). PUROMICINA POATE FORMA O LEGĂTURĂ PEPTIDICĂ CU UN AMINOACID ANTERIOR LEGAT DE LANȚUL PEPTIDIC (PRIN GRUPAREA $–NH_2$), ÎNSĂ ÎMPIEDICĂ LEGAREA AMINOACIDULUI URMĂTOR, OPRIND CREŞTEREA LANȚULUI PEPTIDIC.

LIZOZOMII, CU ROL ÎN ACTIVITATEA DIGESTIVĂ A CELULEI, POT FI AFECTAȚI DE TOXICI PRIN URMĂTOARELE MECANISME:

◎ AFECTAREA PERMEABILITĂȚII MEMBRANELOR: LIZOZOMII CONȚIN ENZIME HIDROLITICE CU PH OPTIM ACID CARE, ÎN MOD OBIŞNUIT, SUNT SEPARATE DE SUBSTRATELE LOR DIN CITOPLASMĂ PRIN MEMBRANA FOSFOLIPIDICĂ A LIZOZOMILOR. DACĂ PERMEABILITATEA MEMBRANARĂ ESTE UŞOR AFECTATĂ, SE PRODUC DEREGLĂRI ÎN TRECEREA APEI ŞI A ELECTROLIȚILOR. ÎN CAZUL ÎN CARE ALTERAREA ESTE PROFUNDĂ SAU MEMBRANA RUPTĂ, ENZIMELE HIDROLITICE SUNT ELIBERATE ŞI ATACĂ CONSTITUENȚII CELULARI DE BAZĂ (NUCLEOTIDE, PROTEINE, LIPIDE, GLUCIDE). ÎN FINAL SE PRODUCE DEREGLAREA ORGANITELOR (MITOCONDRII ŞI RETICUL ENDOPLASMATIC), URMATĂ DE CITOLIZĂ.

PRINCIPALA CAUZĂ A MODIFICĂRII PERMEABILITĂȚII MEMBRANARE ESTE ANOXIA, IAR ACEASTA ESTE CONSECINȚA DEREGLĂRII RESPIRAȚIEI CELULARE ŞI A PRODUCERII DE ENERGIE. MODIFICAREA PERMEABILITĂȚII MEMBRANARE ESTE PRODUSĂ DE HEPATOTOXICI (CCL_4), SULFAT DE STREPTOMICINĂ, DIGITALICE, DNOC ETC.;

◎ INTERVENIREA ÎN FAGOCITOZĂ, DE PILDĂ, CU FORMARE DE VACUOLE;

◎ MODIFICAREA REACȚIILOR DIN INTERIORUL LIZOZOMILOR, CA ÎN CAZUL DETERGENȚILOR NEIONICI.

3. ACȚIUNEA TOXICILOR LA NIVEL MOLECULAR

O MARE PARTE DIN EFECTELE TOXICE SUNT CONSECINȚA INHIBIȚIEI ENZIMATICE. ACEASTA POATE FI:

◎ COMPETITIVĂ, CÂND INHIBITORII, FIIND ANALOGI CHIMICI AI SUBSTRATULUI, INTRĂ ÎN COMPETIȚIE CU ACESTA PENTRU OCUPAREA CENTRILOR ACTIVI AI ENZIMEI, FORMÂND COMPLEXUL INHIBITOR-ENZIMĂ. CU CÂT CONCENTRAȚIA SUBSTRATULUI ESTE MAI MARE, CU ATÂT CAPACITATEA INHIBITORULUI DE A FORMA COMPLEXUL CU ENZIMA ESTE MAI MICĂ;

◎ NECOMPETITIVĂ, CÂND INHIBITORII NU AU STRUCTURĂ ANALOGĂ SUBSTRATULUI, DECI NU CONCUREAZĂ PENTRU CENTRII ACTIVI ENZIMATICI, IAR CONCENTRAȚIA SUBSTRATULUI NU INFLUENȚEAZĂ EFECTUL INHIBITORILOR. EXISTĂ INHIBITORI NECOMPETITIVI REVERSIBILI, CARE INDUC DOAR O ÎNCETINIRE A REACȚIEI ENZIMATICE, ŞI INHIBITORI NECOMPETITIVI REPETITIVI IREVERSIBILI, CARE DETERMINĂ INACTIVAREA ENZIMEI.

UN TIP APARTE DE COMPETIȚIE ENZIMATICĂ ESTE COMPETIȚIA ALOSTERICĂ, CU ROL IMPORTANT ÎN REGLAREA ACTIVITĂȚII ENZIMATICE. NUMEROASE ENZIME POSEDĂ DOI CENTRI CAPABILI SĂ FIXEZE SUBSTANȚELE: UN CENTRU IZOSTERIC (ACTIV) CARE LEAGĂ SUBSTRATUL ŞI COMPUŞII ÎNRUDIȚI STRUCTURAL, REALIZÂND CATALIZA; UN CENTRU ALOSTERIC, CARE LEAGĂ COMPUŞII DIFERIȚI STRUCTURAL DE SUBSTRAT, CU ROL DE INHIBITORI SAU ACTIVATORI. FIXAREA UNUI INHIBITOR ◎ DE EXEMPLU CITRATUL DIN CICLUL KREBS PE CENTRUL ALOSTERIC AL FOSFOKINAZEI ◎ DETERMINĂ MODIFICĂRI CONFORMAȚIONALE ALE ENZIMEI LA NIVELUL CENTRULUI ACTIV, SCĂZÂNDU-I AFINITATEA FAȚĂ DE SUBSTRAT ◎ CU LIMITAREA, ÎN EXEMPLUL DAT, A GLICOLIZEI (FIG. 5).

PRINCIPALELE MECANISME DIN INTERACȚIUNEA TOXIC-ENZIMĂ SUNT:

◎ DENATURAREA PROTEIN-ENZIMEI (APOENZIMEI), PRIN ACIZI ŞI BAZE TARI, FENOL, FORMALDEHIDĂ, METALE GRELE;

◎ BLOCAREA GRUPĂRILOR REACTIVATE ALE APOENZIMEI (-SH, -OH, $-NH_2$, -COOH); DE EXEMPLU, GRUPĂRILE –SH SUNT BLOCATE DE AGENȚI OXIDANȚI (FERICIANURĂ), COMPUŞI DE ARSEN, METALE GRELE (PB, HG), AGENȚI ALCHILANȚI (IODACETAT, IODAMIDĂ);

◎ MODIFICAREA CONFORMAȚIONALĂ A ENZIMEI: ANUMIȚI TOXICI ÎNGUSTEAZĂ, DE EXEMPLU, LA ALCOOLDEHIDROGENAZĂ, CALEA DE ACCES A ETANOLULUI SPRE CENTRUL ACTIV;

◎ COMPETIȚIA CU GRUPAREA PROSTETICĂ: CN◎ COMPLEXEAZĂ FE^{3+} DIN CITOCROMOXIDAZĂ;

◎ COMPETIȚIA CU COENZIMA: ACIDUL PIRIDIN-3-SULFONIC ŞI ACETIL-3-PIRIDINA ACȚIONEAZĂ CA ANTIMETABOLIȚI AI NICOTINAMIDEI DIN COMPOZIȚIA COENZIMELOR NAD ŞI NADP;

◎ COMPLEXAREA METALULUI ACTIVATOR: FLUORUL COMPLEXEAZĂ MG DIN ENOLAZĂ; SULFURA DE CARBON, DISULFIRAMUL, DITIOCARBAMAȚII COMPLEXEAZĂ CU DIN CITOCROMOXIDAZĂ, ALDEHIDDEHIDROGENAZĂ, MONOAMINOOXIDAZĂ, TIROZINAZĂ ŞI ZN DIN ANHIDRIDA CARBONICĂ, LACTIC DEHIDROGENAZĂ, ALCOOLDEHIDROGENAZĂ; CHELATANȚII (EX. SĂRURILE ACIDULUI EDETIC ◎ EDTA) SPOLIAZĂ ORGANISMUL DE UNELE METALE BIVALENTE;

◎ COMPETIȚIA CU SUBSTRATUL;

◎ SUSTRAGEREA SUBSTRATULUI (H_3ASO_3 REACȚIONEAZĂ CU GLICERALDEHIDA CU FORMARE DE ACID FOSFOARSENGLICERIC, ŞI PRIVEAZĂ ETAPA URMĂTOARE A GLICOLIZEI DE ACIDUL DIFOSFOGLICERIC, SUBSTRATUL NORMAL).

SINTEZA LETALĂ ESTE PROCESUL PRIN CARE O SUBSTANȚĂ EXOGENĂ NETOXICĂ ESTE TRANSFORMATĂ ÎN ORGANISM ÎNTR-UNA TOXICĂ. ESTE CAZUL FLUORACETATULUI CARE *IN VITRO* NU ESTE TOXIC PENTRU ENZIMELE CICLULUI KREBS; *IN VIVO,* DIN

FLUORACETAT ACTIV ŞI OXALOACETAT SE SINTETIZEAZĂ FLUORCITRAT. ACESTA INHIBĂ ACONITAZA (ENZIMA DIN ETAPA CITRAT-OXALOACETAT), BLOCÂND CICLUL KREBS. CA URMARE A LEZIUNII BIOCHIMICE LA ACEST NIVEL, ORGANISMUL ESTE PRIVAT DE ENERGIE, IAR CITRATUL SE ACUMULEAZĂ ÎN ȚESUTURI, LEGÂND CA^{2+}, SPOLIIND ORGANISMUL DE ACEST ELEMENT.

ALTERAREA METABOLISMULUI CELULAR. UNII ANTIMETABOLIȚI, FIIND ANALOGI CHIMICI AI METABOLITULUI NORMAL, ACȚIONEAZĂ PRIN ÎNLOCUIREA ACESTUIA, DETERMINÂND FIE OPRIREA REACȚIEI, FIE FORMAREA UNUI NOU METABOLIT CARE ÎNCETINEŞTE SAU OPREŞTE REACȚIA URMĂTOARE DIN LANȚUL METABOLIC. DE PILDĂ, SULFANILAMIDA SE SUBSTITUIE ÎN BACTERII ACIDULUI P-AMINOBENZOIC, ÎMPIEDICÂND SINTEZA ACIDULUI FOLIC; DICUMAROLUL SE SUBSTITUIE VITAMINEI K, DETERMINÂND HEMORAGII; ACIDUL PIRIDIN-3-SULFONIC ÎNLOCUIEŞTE NICOTINAMIDA DIN NAD ŞI NADP ŞI DE ASEMENEA, CARENȚEAZĂ ORGANISMUL ÎN NICOTINAMIDĂ; ETIONINA, ANALOG METIONINEI, INDUCE O LEZIUNE BIOCHIMICĂ PRIN FORMAREA S-ADENOZIL-ETIONINEI ÎN LOCUL S-ADENOZIL-METIONINEI, CU IMPLICAȚII ÎN PROCESUL DE METILARE ŞI ÎN SINTEZA PROTEICĂ; 6-TIOPURINA ŞI 5-FLUOROURACILUL INTERFERĂ CU BAZELE NORMALE ALE ACIZILOR NUCLEICI, REALIZÂND O “ÎNCORPORARE LETALĂ” ETC.

EFECTE NOCIVE ASUPRA ACIZILOR NUCLEICI. BAZELE AZOTATE CONȚIN PERECHI DE ELECTRONI NEPARTICIPANȚI ŞI POT ACCEPTA STRUCTURI ELECTROFILE. CANCERIGENII SUNT SUBSTANȚE CU STRUCTURĂ FOARTE VARIATĂ, ÎNSĂ MAJORITATEA LOR SUNT REACTANȚI ELECTROFILI. UNII CANCERIGENI ŞI AGENȚI ANTITUMORALI ◎ IONI METALICI, AGENȚI ALCHILANȚI ◎ SUNT ELECTROFILI “PER SE”. ALȚII, HIDROCARBURI POLICICLICE CONDENSATE, NITROZAMINE, AMINE AROMATICE POLICICLICE, SUNT DE FAPT PRECANCERIGENI ŞI NECESITĂ O PREALABILĂ ACTIVARE METABOLICĂ CÂND SE FORMEAZĂ PRECURSORI CANCERIGENI ŞI ÎN FINAL METABOLITUL ULTIM, CANCERIGEN, PUTERNIC ELECTROFIL. ACESTA SE POATE DETOXICA PRIN

METABOLIZARE SAU SE POATE FIXA COVALENT PE ADN, MACROMOLECULA ȚINTĂ, SAU PE ALTE MOLECULE PROTEICE. ALȚI CANCERIGENI DETERMINĂ PERTURBĂRI ÎN PROPRIETĂȚILE ADN FĂRĂ INTERVENȚIA LEGĂTURII COVALENTE, PRIN SIMPLĂ INTERCALARE ÎN DUBLA ELICE A ACESTUIA.

INTERACȚIUNEA XENOBIOTIC-RECEPTOR. RECEPTORII FARMACOLOGICI SUNT FORMAȚIUNI INFRASTRUCTURALE ALE CELULEI, AVÂND PROPRIETATEA DE A LEGA, MAI MULT SAU MAI PUȚIN SPECIFIC, ANUMITE MOLECULE ENDOGENE ŞI EXOGENE (MEDICAMENTE ŞI TOXICI). MAJORITATEA RECEPTORILOR SUNT PORȚIUNI ALE MEMBRANEI. ALȚII SE GĂSESC ÎN CITOPLASMĂ SAU ÎN SUBUNITĂȚI ALE UNEI MOLECULE DE ENZIMĂ.

INHIBITORUL (TOXIC, CHIMIOTERAPIC) ARE AFINITATE PENTRU RECEPTOR CU CARE POATE FORMA UN COMPLEX.

INTERFERENȚA ÎN NEUROTRANSMISIE POATE AVEA LOC PRIN DIFERITE MECANISME ŞI LA DIVERSE NIVELE ALE SISTEMULUI NERVOS, DATORITĂ: AGENȚILOR BLOCANȚI AI RECEPTORILOR COLINERGICI SAU ADRENERGICI LA SINAPSELE INTERNEURONALE SAU LA JONCȚIUNILE NEUROEFECTOARE; UNOR INHIBITORI AI SINTEZEI ŞI ELIBERĂRII NEUROTRANSMIȚĂTORILOR; UNOR SUBSTITUIENȚI AI NEUROTRANSMIȚĂTORILOR, CU ACȚIUNE PROPRIE COLINERGICĂ SAU ADRENERGICĂ.

EFECTE TOXICE ASUPRA TRANSPORTULUI, DIFUZĂRII ŞI UTILIZĂRII OXIGENULUI, CA ŞI ASUPRA STOCĂRII ENERGIEI:

◎ *BLOCAREA TRANSPORTULUI DE OXIGEN:* CO INTRĂ ÎN COMPETIȚIE CU O_2 PENTRU HB ŞI FORMEAZĂ CARBOXIHEMOGLOBINA, BLOCÂND TRANSPORTUL DE OXIGEN LA ȚESUTURI. NITRIȚII NITRO- ŞI AMINODERIVAȚII AROMATICI, PRECUM ŞI ALTE METHEMOGLOBINIZANTE TRANSFORMĂ HB (FE^{2+}) ÎN METHB (FE^{3+}) CARE NU TRANSPORTĂ OXIGENUL. TOTUŞI, MICI CANTITĂȚI DE METHB SUNT REDUSE LA HB ÎN HEMATII. DACĂ METHB ESTE ÎN CANTITATE MARE SAU ÎN DEFICIT DE GLUCOZO-6-FOSFAT-DEHIDROGENAZĂ, REDUCEREA SPONTANĂ NU SE MAI REALIZEAZĂ.

SULFONAMIDELE ÎN PREZENȚA METHEMOGLOBINIZANTELOR TRANSFORMĂ HB ÎN SULFHEMOGLOBINĂ, NETRANSPORTOARE DE OXIGEN. DERIVAȚII DE HIDRAZINĂ LEZEAZĂ MEMBRANA ERITROCITARĂ CU ELIBERAREA HB DIN ERITROCIT (HEMOLIZĂ), IAR HEMOGLOBINA PLASMATICĂ NU TRANSPORTĂ OXIGENUL;

- *ÎMPIEDICAREA DIFUZĂRII OXIGENULUI:* UNII ANESTEZICI (ETER, HALOTAN) ŞI SOLVENȚI ORGANICI NEPOLERI SE ACUMULEAZĂ ÎN LIPIDELE MEMBRANARE ŞI ÎMPIEDICĂ DIFUZAREA OXIGENULUI ŞI GLUCOZEI ÎN INTERIORUL CELULEI. NEURONUL ESTE DEOSEBIT DE SENSIBIL LA LIPSA ACESTOR SUBSTANȚE;

- *ÎMPIEDICAREA UTILIZĂRII OXIGENULUI:* CIANURILE COMPLEXEAZĂ FE^{3+} DIN CITOCROMOXIDAZĂ; TRANFERUL DE ELECTRONI PE LANȚUL MITOCONDRIAL POATE FI BLOCAT LA DIFERITE NIVELE; ACIDUL FLUORACETIC BLOCHEAZĂ CICLUL KREBS LA NIVELUL ACONITAZEI;

- *RISIPIREA ENERGIEI SUB FORMĂ DE CĂLDURĂ:* DINITROFENOLUL ŞI DINITROORTOCREZOLUL PRODUC DECUPLAREA FOSFORILĂRII OXIDATIVE, CÂND OXIGENUL ESTE BINE UTILIZAT, ÎNSĂ ENERGIA NU SE ACUMULEAZĂ ÎN FOSFAȚII MACROERGICI (ATP) PUTÂND FI APOI UTILIZATĂ DE CELULE, CI SE PIERDE SUB FORMĂ DE CĂLDURĂ.

ANTAGONISMUL ÎNTRE IONI: CD^{2+} ESTE ANTAGONISTUL ZN^{2+} ŞI CU^{2+}, PROBABIL PRIN COMPETIȚIE PENTRU SITUSURILE DE TRANSPORT.

INDUCEREA REACȚIILOR DE SENSIBILIZARE: UNII TOXICI (IZOCIANAȚI, FORMALDEHIDĂ, ANHIDRIDĂ FTALICĂ ETC.) ŞI MEDICAMENTE (ANTIBIOTICE, SULFAMIDE, ANTIPIRETICE-ANALGEZICE, ETC.) INDUC SENSIBILIZARE DATORITĂ PROPRIETĂȚII DE A JUCA ROL DE HAPTENĂ. ACEASTA SE UNEŞTE ÎN ORGANISM CU O MACROMOLECULĂ, REALIZÂND ANTIGENE CARE DETERMINĂ, CA RĂSPUNS, SINTEZĂ DE ANTICORPI.

4. FACTORII DETERMINANȚI AI TOXICITĂȚII

Factori dependenți de substanță. Toxicitatea unei substanțe depinde de doza, structura chimică, puritatea, modul de administrare şi interacțiunile sale cu alți compuşi.

Structura chimică. Grupările chimice conferă caracterul hidro- sau liposolubil şi, deci, şi tipul de acțiune biologică. Grupările toxofore: =C=, =S, $-NO_2$, −N=C<, −CN, ≡P<, asemănătoare grupărilor cromofore din coloranți, sunt responsabile de toxicitate, iar grupările autotoxe (halogeni, oxizi inferiori, $-NH_2$, >C=C<, $-C_6H_5$, $-C_6H_4$, $-CH_2-$), asemănătoare grupelor auxocrome, intensifică acțiunea toxică.

Stereoizomeria determină variații în intensitatea şi tipul de acțiune toxică, datorită faptului că substanțele biologic active reacționează cu receptorii (enzimele) care, de regulă sunt substanțe optic active. Asemănarea sau diferențierea în structura izomerilor optici dirijează formarea legăturilor toxic-receptor. Izomerii geometrici pot determina de asemenea variații ale intensității legăturii toxic-receptor datorită distanței dintre grupările reactive, conformației etc.

Activitatea electronică (distribuția şi conformația electronică în moleculă) influențează toxicitatea. Se consideră că electronii π de valență sunt activi biologic. Densitatea electronică inegală în diferite puncte ale moleculei îi conferă polaritate şi centri de maximă densitate electronică. Aceste conformații electronice determină un anumit tip de activitate. Până în prezent relația structură-toxicitate nu poate fi prezentată legic.

5. Proprietățile fizico-chimice ale toxicilor

Starea de agregare influențează pătrunderea toxicilor în organism; toxicii gazoşi acționează rapid şi intens când pătrund pe cale respiratorie.

Masa moleculară mare şi gradul mic de dispersie influențează negativ viteza de absorbție.

Forma amorfă asigură o dizolvare şi o absorbție mai rapidă decât forma cristalină pentru aceeaşi substanță (ex. morfină, stricnină şi novocaină). În unele cazuri, substanțele sunt active numai în formă amorfă, deoarece hidroliza la nivel gastrointestinal nu afectează forma cristalină, încât substanța nu poate fi absorbită(de ex. stearatul şi palmitatul de cloramfenicol). Polimorfismul are implicații în cinetica toxicilor, deoarece structura cristalină imprimă stabilitate sau instabilitate termodinamică formei respective. Forma cristalină stabilă prezintă solubilitate redusă, punct de topire crescut şi stabilitate chimică crescută, întârziind absorbția.

Volatilitatea crescută măreşte riscul intoxicării.

Hidro- şi liposolubilitatea, ca şi raportul lipo/hidrosolubilitate influențează cinetica absorbției. O substanță insolubilă nu poate fi absorbită. Dizolvarea este condiționată, în primul rând de lipofilie (dependentă de grupările chimice) deoarece membrana de traversat este lipoidică, iar molecula trebuie să se dizolve în ea. În plus, după depăşirea membranei, molecula difuzează în apa protoplasmatică, apoi în apa extracelulară, încât trebuie să posede o

anumită hidrofilie. De aceea, moleculele cu un coeficient mediu de repartiție lipide/apă (coeficient Owerton-Meyer) sunt cel mai bine absorbite.

— În cazul pătrunderii pe *cale respiratorie,* când hidrosolubilitatea este mare (coeficient lipide/apă mic) —alcoolul — organismul are o capacitate de absorbție mare. Saturarea organismului şi eliminarea pulmonară au loc lent, ceea ce conduce la intoxicații în timp, prin acumulare. Din contra, atunci când hidrosolubilitatea este mică (coeficient lipide/apă mare) — benzenul — saturarea organismului şi eliminarea pulmonară au loc rapid, producându-se intoxicații acute.

— În cazul pătrunderii *transcutanate,* riscul intoxicației depinde deopotrivă de liposolubilitate şi de hidrosolubilitate. De aceea, substanțele cu coeficient lipide/apă mediu —eterul — prezintă un risc cutanat crescut.

— *Calea digestivă*, este aplicabilă atât substanțelor hidrosolubile cât şi celor liposolubile. Absorbția substanțelor disociabile este influențată de pH-ul segmentului digestiv respectiv.

Ionizare, pH-pK: acizii slabi (barbituric, salicilic), neionizabili în mediu acid, sunt absorbiți în stomac, pe când bazele slabe (alcaloizi, amfetamină, imipramină), puternic ionizate în mediu acid, sunt absorbite în duoden, al cărui mediu este alcalin.

Puritatea şi concentrația. Impuritățile pot influența acțiunea toxică. Conservarea necorespunzătoare este capabilă să modifice toxicitatea (acizii păstrați în recipiente de plumb, dizolvă metalul devenind toxici). Perioada de recoltare, aria geografică, condițiile meteorologice influențează conținutul în principii active al plantelor. Operațiile de spălare, fierbere, etc., pot micşora toxicitatea ciupercilor. Concentrația din produs determină, de regulă, creşterea toxicității; în unele cazuri însă, concentrațiile mari micşorează permeabilitatea mucoasei reducând apreciabil absorbția toxicului la acel nivel (ex. HCl conc.).

Calea şi viteza de administrare. Calea de administrare influențează intensitatea acțiunii toxice, perioada de latență până la apariția efectului toxic, precum şi durata acțiunii toxice. De asemenea, poate fi modificat tipul de acțiune ($MgSO_4$ administrat oral este purgativ, iar parenteral, este deprimant al SNC). În raport cu calea de administrare, absorbția se realizează cu viteze diferite şi poate interveni sau nu detoxicarea hepatică înaintea pătrunderii toxicului în circulația generală. Toxicitatea este influențată, de asemenea, de viteza de administrare a toxicului.

Interacțiuni. Două sau mai multe xenobiotice interacționează între ele sau cu anumiți constituenți ai alimentelor.

Efectul interacțiunii poate fi:

Sinergic, când cele două substanțe au acelaşi sens de acțiune. Dacă suma efectelor este egală sau mai mică decât efectele celor două substanțe considerate separat (ex. bromuri alcaline) se obține *sumare* sau *adiție.* Dacă suma lor este mai mare, efectul reprezintă o *potențare* (barbiturice + etanol, morfină + amfetamină).

Indiferent, când acțiunea celor două substanțe se desfăşoară independent una de alta, fără a interacționa între ele.

Antagonic, când acțiunea celor două substanțe are sens contrar, rezultând un efect global micşorat, nul sau inversat (de pildă, anticolinergice + morfină, antiparkinsoniene + fenotiazine etc.).

Nivelul interacțiunii poate fi oricare din fazele cineticii (tab. 7) şi de asemenea faza dinamică.

Mecanisme de interacțiune cinetică între xenobiotice (după Sellers): *Absorbția* ─ modificări fizico-chimice în tubul digestiv; variații ale motilității gastrointestinale; leziuni ale mucoaselor gastrointestinale.
Fixarea pe proteine ─ fixarea pe proteine plasmatice; fixarea pe receptorii tisulari.
Distribuția
Metabolizarea ─ inducția enzimatică şi inhibiția enzimatică
Eliminarea ─ interferențe în transport la nivelul tubilor urinari şi interferențe în procesele de conjugare biliară sau de transport

Absorbția poate fi stimulată sau inhibată la administrarea orală a două sau mai multe xenobiotice, prin:

─ Modificări fizico-chimice în tubul digestiv, datorate: variației pH-ului gastric sau intestinal (substanțele antiacide scad absorbția substanțelor acide); chelatării sau complexării cu întârzierea absorbției(sărurile metalelor grele + agenți chelanți, săruri de calciu, magneziu, fier, aluminiu + tetracicline); neutralizării reciproce (heparină + protamină);

─ Variații ale motilității gastrointestinale: laxativele şi colinergicele, crescând peristaltismul, reduc absorbția riboflavinei, care are loc predominant în porțiunea superioară a intestinului subțire (sediul principal al absorbției) şi facilitează absorbția vitaminei B_{12} din ileon; anticolinergicele, scăzând peristaltismul, produc efecte inverse în absorbția riboflavinei şi vitaminei B_{12};

─ Leziuni ale mucoaselor gastrointestinale sunt observate în cazul substanțelor corozive, caustice, colchicinei, neomicinei etc.

Fixarea pe proteine (*plasmatice* sau *receptori tisulari*) poate fi modificată prin două mecanisme:

Competiția pentru proteinele plasmatice (în timpul transportului sau depozitării) are loc pentru centrii oferiți de proteine, între două substanțe, ambele cu afinitate pentru acestea. Substanțele cu afinitatea cea mai mare(cu caracter acid, ca fenilbutazona, acidul tricloracetic sau bazic, ca imipramina, difenilhidantoina) ocupă locul celeilalte substanțe. Aceasta, împiedicată să se fixeze,rămasă liberă, se echilibrează la locul acțiunii la un nivel mai ridicat, rezultând potențare. Astfel, warfarina se fixează pe proteinele plasmatice în proporție de 97%, rămânând liberă numai 3%; dacă o substanță competitivă deplasează din fracțiunea fixată încă 3%, concentrația formei libere se dublează, crescând în mod periculos cantitatea de protrombină la subiecții tratați cronic cu anticoagulante. Alt dezavantaj al deplasării competitive este încărcarea ficatului (care metabolizează fracțiunea rămasă liberă) şi a rinichiului (care o filtrează glomerular). Prin creşterea metabolismului şi a clearance-ului

renal, rezultă o perioadă plasmatică redusă şi o scădere progresivă a concentrației plasmatice totale a substanței până în momentul când concentrația plasmatică liberă atinge nivelul avut anterior administrării substanței competitive pentru proteinele plasmatice. Starea de echilibru care se stabileşte acum se caracterizează printr-o concentrație plasmatică totală inferioară, o concentrație a fracțiunii libere egală şi un nivel de activitate egal cu acelea anterioare interacțiunii cu substanța competitivă. Deşi dezechilibrul determinat de competiția pentru proteinele plasmatice este doar tranzitoriu, totuşi, în cazul potențării, efectele inhibiției parțiale a fixării pe proteine pot fi deosebit de grave;

Competiția pentru receptorii tisulari (sau centrii activi) determină modificări în structura terțiară a proteinei (cu reducerea numărului centrilor de fixare) dacă unele substanțe, împiedicate să se fixeze pe proteina specifică, se fixează pe alți centri.

Distribuția substanțelor în cele trei compartimente hidrice poate suferi modificări. Modificarea pH-ului (rezultat al proceselor metabolice sau al acțiunii xenobioticelor) nu este uniformă în compartimentele extra- şi intracelular. Ca urmare, datorită difuziei neionice, se produce o trecere selectivă a xenobioticelor dintr-un compartiment într-altul. Astfel, substanța se acumulează în compartimentul cu pH mai alcalin şi invers. Au loc modificări ale concentrației plasmatice şi tisulare ale xenobioticelor, fără ca aceste modificări să se repercuteze asupra absorbției sau eliminării (de exemplu, fenobarbitalul, cu acțiune intracelulară, pierde din activitatea sa în prezența bicarbonatului de sodiu, realizând o concentrație plasmatică mai mare).

Metabolizarea: prin unele asocieri de xenobiotice se poate determina creşterea sau scăderea ratei de metabolizare – cu toate consecințele sale pentru toxicitate – prin fenomenul de inducție sau de inhibiție enzimatică.

Inducția enzimatică reprezintă accelerarea metabolizării xenobioticelor ca urmare a stimulării sintezei şi activității enzimelor microzomiale. Inducția are loc în cazul hipnoticelor, sedativelor, narcoticelor, stimulanților SNC, analgezicelor-antipireticelor, etanolului, unor pesticide, substanțelor cancerigene etc.

Inhibiția enzimatică este fenomenul invers inducției şi este observată la iproniazidă, catron, nialamină, cloramfenicol, compuşi organofosforici, ozon, tetraclorură de carbon.

Eliminarea este accelerată sau întârziată prin:

–Competiție pentru folosirea aceleaşi căi (penicilina şi probenecidul folosesc, ambele, transportul activ tubular, rezultând întârzierea eliminării penicilinei, cu prelungirea activității sale);

–Alcalinizarea sau acidifierea urinei (alcalinizanârzierea eliminării penicilinei, cu prelungirea activității sale);

–Alcalinizarea sau acidifierea urinei (alcalinizanții ionizează barbituricii, sulfamidele, salicilații, împiedicându-le reabsorbția şi accelerându-le eliminare; dimpotrivă, acidifianții grăbesc eliminarea amfetaminei, imipraminei, antipirinei, bazelor purinice).

Faza toxicodinamică: interacțiunile pot avea loc şi în aceeaşi fază, la nivelul unor receptori. Astfel, nalorfina intră în competiție cu morfina la nivelul receptorilor celulari; alcoolul şi barbituricele se potențează pentru că acționează la acelaşi nivel; diureticele determină scăderea ionilor de potasiu, potențând acțiunea curarizantelor etc.

Pericolul asocierii xenobioticelor constă în: posibilitatea creşterii toxicităţii substanţelor nocive; intensificarea activităţii şi toxicităţii unor medicamente (în special cu margine îngustă de siguranţă); anularea efectului farmacologic, uneori cu rezultat fatal, ca în cazul coagulantelor.

6. Factorii dependenţi de organism

Există diferenţe calitative şi cantitative în efectul toxic între speciile animale, ca şi între animal şi om: talidomida este teratogenă la om şi iepure, dar nu la hamster; toxicitatea alfanaftilureei este de peste 500 de ori mai mare la maimuţă decât la şobolan. Aceste diferenţe prezintă interes pentru interpretarea datelor experimentale şi depind de mai mulţi factori.

Factori de care depind diferenţele efectului toxic între specii

Variaţii în absorbţie, distribuţie, eliminare	Variaţii în rata şi calea de metabolizare (ambele fiind funcţie de enzimele de metabolizare	Variaţii în calitatea şi cantitatea receptorilor
— Paraquatul se absoarbe de 20 de ori mai intens la şobolan decât la om; — Sulfatioxazolul se fixează pe proteinele serice în procent de 16% la om şi de 69% la şoarece; — Feniltioureea este de 50 de ori mai puţin toxică la cobai decât la şobolan, deoarece cobaiul este mai puţin sensibil la metabolitul toxic (H_2S), iar eliminarea se realizează în majoritate ca sulfuri metalice neutre şi cu viteză mare	— Hexobarbitalul şi antipirina sunt metabolizate de 3-6 ori mai rapid la şoarece decât la iepure, dar anilina este metabolizată cu aceeaşi rată la ambele specii; — p-clorfentermina nu poate fi hidrolizată la şobolan; — Fenolul nu este conjugat cu acidul glucuronic la pisică; — Amfetamina se hidrolizează preponderent la catena laterală la om şi la unele specii de laborator şi se p-hidroxilează numai la şobolan; — N-acetilaminofluorenul (AAF), precancerigen, este N-hidroxilat la N-hidroxi-AAF, precursor cancerigen la om, şoarece, şobolan, câine, nu şi la cobai	— Histamina se manifestă la cobai prin constricţie bronşică, la câine prin hipotensiune, la om prin ambele efecte; şobolanul este insensibil la histamină, pe când cobaiul sucombă la doze mici

Sexul. S-a constatat o mai mare frecvență şi intensitate a reacțiilor adverse şi a toxicității la unele medicamente şi toxici, la femeie ță de bărbat. Au fost incriminați factori psihosomatici, metabolici (metabolizarea ar fi mai lentă la femeie), hormonali (la animal, diferența de toxicitate între sexe a fost observată numai după pubertate sau după castrare).

Vârsta. Fetusul şi nou-născutul prezintă o sensibilitate deosebită la numeroase medicamente, în funcție de mecanismele de acțiune ale acestora. Vârstnicii manifestă o frecvență crescută a accidentelor terapeutice, datorită mai multor factori.

Graviditatea. Placenta este permeabilă pentru unele xenobiotice sau poate interveni direct în biotransformarea lor. Majoritatea xenobioticelor cu M<1000 traversează placenta prin transfer activ sau pasiv şi se regăsesc în sângele fetusului. Transferul este maxim între săptămâna a 6-a şi a 20-a de gestație. În placentă pot avea loc reacțiile din faza I a metabolizării, însă reacțiile din faza a II-a sunt deficitare din cauza activității reduse a glucuronil-transferazei. Factorii responsabili de sensibilitatea embrionului la xenobiotice sunt redați în tabelul 11.

Masa şi suprafața corporală. S-a constatat la animal că exemplarele cu masă corporală mică necesită, proporțional, o cantitate mai mare de substanță pentru a răspunde în acelaşi mod ca animalele cu masă corporală mare (din aceeaşi specie).

Starea psihică. Substanțele biologic active acționează sinergic cu nivelul stresului.

Stările patologice. Afecțiunile renale scad eliminarea substanțelor excretabile preponderent pe cale urinară (antibiotice, digitalice), crescându-le semiviața plasmatică; dacă dozele nu sunt reduse, pot apărea efecte toxice. Afecțiunile hepatice determină încetinirea sau insuficiența metabolizării medicamentelor, rezultând acumularea lor (2-metilaminofluorenul formează derivatul N-hidroxi, cancerigen, într-o rată mai mare la animalele tarate hepatic).

Factorii genetici. Până în prezent evidențiat mai multe enzimopatii, corelate cu absorbția unor xenobiotice, de ex.:

Factori determinanți ai frecvenței crescute a accidentelor toxice la vârstnici (după Heusghem)

Factori ca influențează (direct sau indirect) fazele cineticii sau dinamica xenobioticelor	Factori care intervin în declanşarea reacțiilor toxice
— Scăderea absorbției digestive (din cauza micşorării secrețiilor, a încetinirii transportului activ etc. — Scăderea capacității de legare a xenobioticelor (metaboliților) de proteinele plasmatice (tisulare), cu creşterea fracțiunii libere; — Scăderea eliminării renale şi biliare;	— Deficiența echilibrului metabolic şi a reglării neurohormonale; — Dereglarea materialului genetic; — Afectarea sistemului vascular; — Formarea autoanticorpilor față de constituenții celulari (tisulari), intacți sau dereglați etc.

─ Scăderea masei celulare active, a cantităţii şi sensibilităţii receptorilor etc.	

Acetiltransferaza inactivează izoniazida (HIN). Există inactivatori rapizi (care elimină rapid HIN) şi inactivatori lenţi (elimină lent HIN); diferenţa între cele două categorii de subiecţi constă în cantitatea de enzimă din ficat – mai mare la inactivatorii rapizi decât la cei lenţi;

Pseudocolinesteraza inactivează, prin hidroliză, succinilcolina; unii subiecţi sunt foarte sensibili la doze de succinilcolină, pentru că plasma lor conţine o variantă anormală de enzimă;

Alcooldehidrogenaza (ADH) este principala enzimă care metabolizează etanolul; s-a decelat la om existenţa izoenzimelor şi a polimorfismului ADH, ceea ce explcă, cel puţin parţial, sensibilitatea rasială şi individuală la efectele etanolului;

Monooxidaza transformă benzantracenul (precancerigen) în epoxid (cancerigen); într-un lot reprezentativ s-a găsit că 10 din subiecţi manifestau activitate monooxidazică puternică, fiind deci expuşi la cancer pulmonar datorat acestei hidrocarburi policiclice existente în mediu (fum deţigară, pulbere de asfalt);

Glucozo-6-fosfat dehidrogenaza (G-6-PD) intervine în metabolizarea glucozei pe cale pentozică; deficitul în această enzimă afectează 3% din populaţia globului, dar deficitul rămâne inaparent până la administrarea unor substanţe oxidante (antimalarice, sulfamide, sulfone, analgezice-antipiretice), când calea pentozică este suprasolicitată şi, deoarece desfăşurarea reacţiilor pe această cale este dejă deficitară (prin lipsa sa G-6-PD), apar hemoliză şi methemoglobinemie, cu manifestările clinice corespunzătoare.

Factori determinanţi ai sensibilităţii embrionului la xenobiotice (după Heusghem)

─ Predominanţa proceselor de multiplicare şi de diferenţiere celulară ─ Imaturitatea enzimelor de biotransformare ─ Posibilitatea stimulării enzimelor de biotransformare prin inductori enzimatici administraţi mamei ─ Structura chimică a xenobioticelor (metaboliţilor) ─ Modul de metabolizare a xenobioticelor ─ Stadiul dezvoltării embrionului ─ Factori genetici şi fiziopatologici materni

Bioritmul. În raport cu cu durata bioritmurilor faţă de durata zilei, acestea se clasifică în ultradiene (peste 24 ore), ciecadiene (aprox. 24 ore) şi infradiene (sub 24 ore). Ritmurile ultradiene se împart, la rândul lor, în săptămânale, lunare, anuale.

Ritmurile ultradiene au fost evidenţiate atât la om cât şi la animal. În general, reacţiile sunt mai rapide şi mai intense în perioada de veghe, când dinamica enzimatică este maximă, corespunzând la o producţie maximă de energie, decât în perioada pasivă (de odihnă şi somn).

Loturi identice de animale au prezentat letalități diferite, în funcție de ora administrării, pentru unii agenți fizici (zgomot, radiații X etc.) şi chimici (nicotină, stricnină, fenobarbital, acetilcolină, etanol). La om, variațiile circadiene au fost evidențiate pentru histamină, salicilat de sodiu, rezerpină, insulină, etanol, lignocaină, clorotiazidă, corticosteroizi etc.

Factorii dependenți de mediu. Alimentația, condițiile de confort, temperatura, presiunea atmosferică, zgomotul, radiațiile ionizante, poluanții din mediu, fumatul etc. au, de asemenea, efecte certe asupra toxicității.

7. Combaterea efectelor toxice

Profilaxia intoxicațiilor. Prin aplicarea măsurilor tehnico-organizatorice şi igieno-sanitare de profilaxie colectivă şi individuală se poate reduce numărul şi gravitatea intoxicațiilor profesionale:

─ Acestea prevăd înlocuirea, acolo unde este posibil, a substanțelor toxice şi/sau modificarea proceselor tehnologice nocive;

─ Legiferarea manipulării substanțelor nocive;

─ Educația sanitară şi instructajele periodice de protecția muncii;

─Folosirea tehnologiilor de fabricare în instalații ermetice şi etanşe, a ventilației adecvate (naturală şi mecanică), a semnalizatoarelor de alarmă la depăşirea CMA etc.;

─ Supravegherea medicală a muncitorilor prin: examen medical la angajare şi depistarea unor predispoziții la intoxicații, înlăturând acele persoane de la locurile de muncă cu noxe şi reducând incidența intoxicațiilor profesionale (profilaxie primară); examen medical periodic şi examene speciale, când se depistează intoxicațiile în stadiu incipient, luând măsuri pentru evitarea agravării lor;

─ Examinarea toxicologică prin determinări ale toxicilor din atmosfera de lucru, ale toxicilor şi metaboliților din lichidele biologice, ale indicatorilor biologici modificați sub acțiunea toxicilor; scopul final este stabilirea măsurilor necesare pentru scăderea concentrațiilor toxicilor sub limita admisă;

─ Izolarea muncitorilor de mediul toxic (când trebuie lucrat într-un astfel de mediu) prin profilaxie individuală: echipament de protecție şi mască, aplicarea de unguiente de protecție, respectarea igienei individuale etc.

Tratamentul intoxicațiilor acute (Primele măsuri de reanimare respiratorie)

Imediat după evacuarea din mediul toxic, dacă intoxicatul prezintă respirație anormală, culoare neobişnuită a tegumentelor (roşie deschisă, albastră, cianotică), tulburări psihice, se trece, chiar la locul accidentului şi în timpul transportului către o unitate sanitară, la aplicarea măsurilor de prim ajutor, şi anume:

Eliberarea căilor respiratorii superioare se face prin desfacerea îmbrăcămintei de la gât, îndepărtarea eventualilor corpi străini din gură (proteze), ştergerea cavității bucale,

aspirarea mucozităţilor. Pentru păstrarea căilor aeriene libere se menţine gura intoxicatului întredeschisă pe tot timpul transportului, iar la intoxicatul inconştient se asigură poziţia de decubit lateral cu ajutorul unei pături făcute sul, ceea ce permite scurgerea lichidelor de secreţie şi previne inhalarea de mucozităţi etc.

Respiraţia artificială se aplică dacă respiraţia nu revine la normal şi se practică prin prin procedeele "gură la gură" sau "gură la nas" (nu se aplică în intoxicaţiile cu HCN, CN^-, gaze toxice, compuşi organofosforici). Intoxicatul va fi plasat în poziţie de decubit dorsal, întins pe un plan orizontal dur, cu capul în hiperextensie (cu ajutorul unui sul aşezat sub cap).

Oxigenoterapia, aplicată atât în cursul respiraţiei spontane, cât şi artificiale, se practică de obicei prin sondă nazofaringiană (în intoxicaţia cu CO este indicată oxigenoterapia hiperbară)

8. Îndepărtarea toxicilor neabsorbiţi

Provocarea de vărsături se aplică în lipsa posibilităţii efectuării spălăturii gastrice. Se administrează intoxicatului 300 ml apă (o cantitate mai mare ar determina forţarea pilorului şi trecerea toxicului în duoden), apoi de declanşează reflexul de vomă prin excitarea mecanică a fundului gâtului. După evacuarea conţinutului gastric se repetă operaţia de ccccâteva ori, cu noi cantităţi de câte 300 ml apă, până la o cantitate totală de 3-4 litri apă. Metoda este contraindicată la intoxicaţii comatoşi, cardiaci, vârstnici hipertensivi şi aterosclerotici, emfizematoşi, gravide şi parţial contraindicată la ingerarea de corozivi şi caustici concentraţi şi în mari cantităţi, sau de distilate petroliere şi detergenţi, precum şi la subiecţii la care toxicul ingerat a provocat covulsii.

Provocarea vărsăturilor se poate realiza prin aplicare de vomitive ca sirop de ipeca sau apomorfină.

Spălătura gastrică realizează îndepărtarea toxicilor neabsorbiţi din stomac. Dacă intoxicatul este conştient se practică spălătura cu apă, suspensie de cărbune activat, cu sau fără antidot, prin sonda Faucher introdusă în stomac pe cale faringo-esofagiană. Dacă intoxicatul este comatos, sonda se introduce pe cale nazală, iar calea aeriană este intubată cu o sondă prevăzută cu un balonaş obturator, pentru a evita aspirarea conţinutului gastric în căile aeriene şi asfixierea intoxicatului. Porţiunile de lichid de spălătură se păstrează pentru analize toxicologice şi chimico-legale.

Purgativul — de obicei sulfatul de sodiu — este administrat după golirea stomacului prin vărsătură sau spălătură (în acest caz purgativul este introdus prin sondă).

Spălarea tegumentelor are rolul împiedicării absorbţiei toxicului transcutanat. După ce se îndepărtează rapid îmbrăcămintea, se spală tegumentele cu apă şi săpun (15 minute), de preferinţă sub duş.

Spălarea sacului conjunctival se realizează cu apă în jet la presiune mică, timp de 5-10 minute, menţinând pleoapele îndepărtate de globul ocular.

9. Administrarea antidoturilor

Antidoturile sunt substanțe capabile să inactiveze toxicii prin fenomene fizice sau reacții chimice (antidoturi chimice sau antidoturi propriu-zise) sau să antagonizeze efectele toxicilor (antidoturi fiziologice sau antagonişti).

Printre însuşirile antidoturilor se pot enumera: acțiunea specifică asupra unui complex funcțional celular; o activitate ridicată; nu determină efecte adverse; nu eliberează, prin biotransformare, metaboliți toxici; posedă un efect antidotic persistent pentru o perioadă de timp cunoscută. Numărul antidoturilor cu aceste calități este restrâns, astfel încât numai 2% din intoxicațiile acute beneficiază de tratament antidotic.

Antidoturile se administrează pe cale orală (înainte, o dată cu, sau după spălătura gastrică) pentru inactivarea toxicilor neabsorbiți din tubul digestiv, sau pe cale orală ori parenterală pentru inactivarea toxicilor deja absorbiți.

Antidoturile care inactivează toxicii din tubul digestiv acționează prin:

Absorbție: cărbunele activat adsoarbe unii toxici organici şi anorganici. Adsorbția este micşorată sau împiedicată de alimentele din stomac care astupă porii particolelor de cărbune, dar nu este practic influențată de pH-ul mediului. Eficacitatea este maximă la 30 minute după ingerarea toxicului, dar antidotul este util şi mai târziu, când toxicul a trecut de pilor.

Oxidoreducere:permanganatul de potasiu, în prezent rar folosit, este eficient în intoxicația cu morfină, atropină, cocaină, barbiturice etc. Activitatea antidotică este accentuată de mediul alcalin şi limitată de causticitatea pentru mucoasa gastrică.

Formare de compuşi insolubili (puțin solubili): albuşul de ou şi laptele, datorită proteinelor din compoziția lor, precipită ca albuminați unii alcaloizi şi săruri de metale grele; fiind emoliente, scad efectele substanțelor corozive şi caustice. Sunt contraindicate în intoxicația cu toxici liposolubili (paration, solvenți organici etc.). *Acidul tanic* este rar folosit datorită hepatoxicității sale; precipită alcaloizii, glicozizii, sărurile metalice. *Sărurile solubile de calciu* (lactat, gluconat, clorură) precipită acidul oxalic, acidul fluorhidric, fluorurile, ca săruri insolubile de calciu. *Oxidul de magneziu* precipită anhidrida arsenioasă, arseniții, ca săruri de magneziu insolubile şi este indicat, de asemenea, în intocsicația cu acizi. *Sulfatul de magneziu* precipită sărurile de bariu şi de plumb, dând combinații insolubile. *Clorura de sodiu* precipită azotatul de argint.

Formaree de compuşi solubili netoxici: unele substanțe antiacide, ca oxidul de magneziu, sunt indicate la îngerarea de acizi; nu se recomADNă administrarea per os de bicarbonat de sodiu şi carbonat de sodiu, deoarece în contact cu acizii degajă CO_2, provocând distensie gastrică soldată uneori cu perforația peretelui stomacal deja lezat. Unele *substanțe antialcaline*, cum ar fi soluția 1% de CH_3COOH, se recomADNă uneori la îngerarea bazelor caustice; este însă mai eficace administrarea, chiar la locul accidentului, de apă potabilă, repetat, şi provocare de vărsături, deoarece mai târziu în intoxicațiile severe actul deglutiției nu mai este posibil. *Soluția de săpun* este antidot pentru detergenții cationici, dând compuşi inactivi (după care se provoacă vărsături).

Chelatorii capabili să stabilească legături cu cationii metalici prin electronii neparticipanți (de la –N, -O, -SH) formează chelați ciclici, stabili, solubili, netoxici. Stabilitatea creşte cu cifra de coordinare a metalului. Utilizarea chelatorilor ca antidot este limitată de : competiția între metalul toxic şi metalele indispensabile organismului pentru

acelaşi chelator (spoliere de metale); competiția între chelatorul antidot şi chelatorii naturali (compuşi cu grupări –SH, ca enzime, tioaminoacizi etc.) pentru acelaşi metal (ineficiența antidotului).

Principalii chelatori cu rol de antidot sunt:

Sărurile acidului etilendiaminotetraacetic (EDTA) (acid edetic) şi compuşii înrudiți (fig. 10) sunt antidoturi în intoxicații cu numeroase metale. De la acidul etilendiaminotetraacetic:



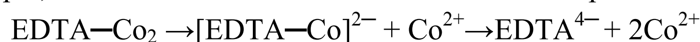
$$(HOOC{-}H_2C)_2N{-}CH_2{-}N(CH_2{-}COOH)_2$$

derivă următoarele antidoturi:

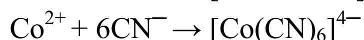
– EDTA–$CaNa_2$ (Edetamin) este antidot în intoxicația cu Pb, precum şi cu alte metale (Ni, Cr, Fe, Cu, Mn, Cd, Co), dar puțin eficace în cazul Hg. Are loc un schimb ionic între calciu şi acel metal toxic cu mai mare afinitate pentru complexon decât Ca. Se formează complexonați (chelați interni) tridimensionali, cu stabilitate diferită, în funcție de constanta lor de disociere.

– EDTA–Na_2 este recomADNat în intoxicația cu digitalice, deoarece complexează Ca^{2+} (crescut în acest tip de intoxicație).

– EDTA–Co_2 (Kelocyanor) este antidot în intoxicația cu CN^-, pe care-l fixează în două trepte, întrucât EDTA–Co_2 se disociază în două trepte:



$$EDTA{-}Co_2 \rightarrow [EDTA{-}Co]^{2-} + Co^{2+} \rightarrow EDTA^{4-} + 2Co^{2+}$$



$$Co^{2+} + 6CN^- \rightarrow [Co(CN)_6]^{4-}$$

Deoarece Kelocyanor se administrează în doză mai mare decât este necesar pentru fixarea CN^-, rămâne un exces de Co^{2+}; din această cauză se administrează, la 15 minute după Kelocyanor, EDTA–$CaNa_2$ care fixează excesul de Co^{2+}. Kelocyanor manifestă toxicitate la

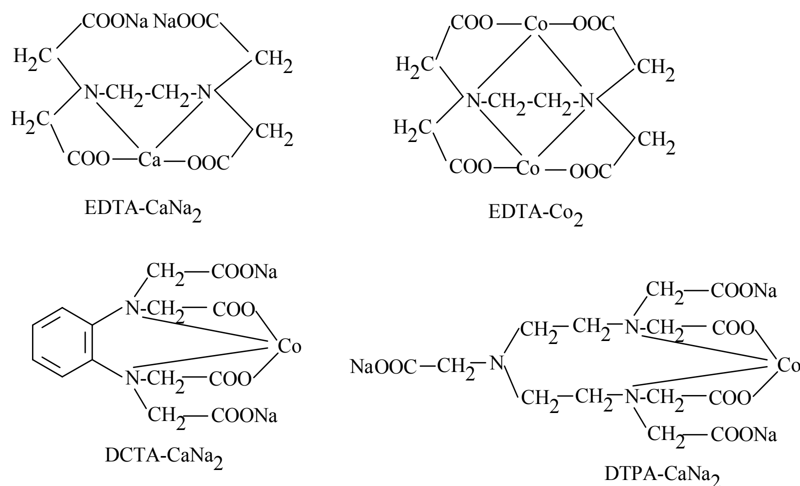


Fig. 4. Săruri ale EDTA si compusi înruditi.

nivel cardiovascular atunci când, din eroare, este administrat unui subiect neintoxicat cu CN^-. La supradozare apar efecte toxice.

– DCTA–$CaNa_2$ (*diaminociclohexantetraacetatul de sodiu şi calciu*) este folosit în intoxicația cu Cd, pentru că formează chelați mai puțin toxici decât EDTA–$CaNa_2$.

─ DTPA─CaNa$_3$ (*dietilentriaminopentaacetatul de sodiu şi calciu)* este recomADNat în intoxicaţia cu radioelemente din seria lantanidelor, ca şi cu unele metale grele (Pb, Fe, Mn).

D-Penicilamina (β, β─dimetilcisteina) (fig. 5) este antidot în intoxicaţia cu metale grele, în special cu Hg (mineral şi organic). De asemenea, este indicată în tratamentul bolii

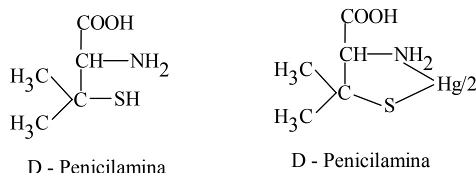


Fig. 5. D - Penicilamina

Wilson (o degenerare hepatolenticulară prin depunere intracelulară de Cu în ficat, consecinţă a unui deficit în ceruloplasmină). Este contraindicată în intoxicaţia cu Cd (formează chelaţi nefrotoxici). Toxicitatea D-penicilaminei fiind redusă, permite un tratament îndelungat; s-au semnalat şi unele reacţii adverse.

Ditiocarb (dietilditiocarbamatul de sodiu), $(C_2H_5)_2N$─C(S)─SNa este recomADNat în special în intoxicaţia cu nichel carbonil.

Desferioxamina (Desferal) (fig. 6)este recomADNată în intoxicaţia cu fier şi în hemocromatoză. Fierul este eliminat prin legare covalentă la nivelul resturilor hidroxamice,

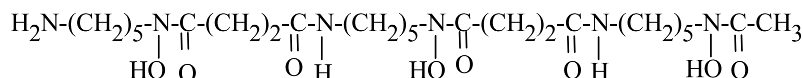


Fig. 6. Desferioxamina (Desferal)

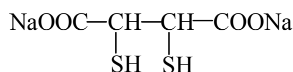
rezultând un complex ferioxamic eliminabil renal. Desferal nu scoate Fe^{2+} din hemoglobină, citocromi etc. şi nici nu spoliază organismul în alte microelemente.

Antidoturi cu grupări ─SH (care nu formează legături coordinative):

Dimercaptopropanolul (DMP) a fost utilizat pentru prima dată (1941) ca antidot al levizitei (se mai numeşte BAL, de la cuvintele British Anti-Lewisite). Este utilizată ca antidot în intoxicaţiile acute cu As şi Hg (mineral), însă este mai puţin eficient în intoxicaţiile cu Cd, Pb, Fe, Se, V, ca şi în cazul leziunilor hepatorenale grave.

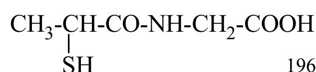
DMP leagă metalul în stare ionică din combinaţiile organice sau fixat pe –SH din enzime (proteine) (fig. 12). Acesta are dezavantajul spolierii organismului de unele metale utile (Cu, Zn, Ca, Mg) şi inactivarea insulinei, citocromoxidazei etc. datorită acţiunii reducătoare a grupărilor ─SH.

Dimercaptosuccinatul de sodiu, este recomADNat în intoxicaţia cu $HgCl_2$ şi a fost



încercat şi în intoxicaţia cu Pb (1978). Este mai puţin toxic decât DMP şi nu spoliază organismul de microelemente.

─ *Thiola (2-mercapto-propionilglicocolul),* este indicat în intoxicaţia cu compuşii Hg.



─ Reactivatorii colinesterazei de tip aldoximic au fost introduşi în terapeutică în 1955 de Wilson. În prezent se folosesc:

Pralidoxima (PAM-2) (metiliodura de piridilaldoximă) şi *obidoxima (toxogonin)* (Cotrău, 1993). Substanțele organofosforice ─ insecticide, substanțe toxice de luptă etc. ─ blochează centrul activ al acetilcolinesterazei (AchE), împiedicând accesul la enzimă al substratului său natural, acetilcolina; aceasta se acumulează la nivelul sinapselor, conducând la fenomene toxice. Reactivarea AchE are loc spontan, dar lent prin hidroliză.

Mecanismul acestei reactivări este următorul: blocarea AchE de către substanțele organofosforice constă din fosforilarea sa, prin stabilirea unei legături covalente între P şi O din hidroxilul serinei (componentă a centrului esterazic al AchE). Aldoxima se plasează cu azotul cuaternar în dreptul centrului anionic al AchE; hidrogenul de pe gruparea oximă reface centrul esterazic al AchE (:N…HO─) iar restul fosforic se leagă de aldoximă, eliberând enzima (v. insecticide organofosforice).

Acest proces are loc dacă tratamentul este aplicat imediat, când enzima este reactivată ("tânără"). Dacă tratamentul este tardiv, enzima este nereactivabilă ("îmbătrânită"), rămânând definitiv blocată. Se presupune că aldoxima reacționează, în afara acestui mecanism de reactivare, şi prin facilitarea transmisiei neuromusculare pre- şi postsinaptice, ceea ce contribuie la revenirea la normal a transmisiei blocată de către organofosforice.

Toxigoninul, deşi are în structură doi radicali amoniu cuaternar, poate străbate bariera hematoencefalică, permițând reactivarea acetilcolinesterazei din SNC.

Antidoturile fiziologice (antagoniştii) sunt:

Atropina este folosită în intoxicația cu substanțe organofosforice, în care caz combate efectele muscarinice declanşate de acumularea de acetilcolină, însă nu acționează asupra blocării periferice a transmisiei neuromusculare din această intoxicație. Administrarea de atropină trebuie efectuată urgent, chiar la locul accidentului, şi în doze mari; pericolul supradozării este mai mic decât cel al subdozării, iar dozele mici de atropină periclitează viața intoxicatului.

Fizostigmina (eserina), o amină terțiară, combate acțiunea substanțelor anticolinergice (colinolitice), fiind un inhibitor reversibil al colinesterazei. Asemănător acționează şi aminele cuaternare *neostigmina (prostigmin), miostin)* şi *piridostigmina*.

Nalorfina, levalorfanul şi naloxanul combat efectele toxice majore ale analgezicelor narcotice de tip morfinic, acționând competitiv asupra aceloraşi receptori şi crescând sensibilitatea centrului respirator față de bioxidul de carbon. Aceşti antagonişti nu sunt recomADNați în intoxicația cu alte deprimante ale SNC.

Vitaminele utilizate ca antidoturi sunt:

Acizii folic şi *folinic* sunt antidoturi în intoxicația cu citostatice (aminopterină, metotrexat). Acidul folic se reduce, succesiv, la acizii di- şi tetrahidrofolic sub acțiunea reductazelor specifice. Acidul tetrahidrofolic trece, prin formilare, în acid folinic, care ia parte la sinteza bazelor purinice şi pirimidinice necesare formării acizilor nucleici. Citostaticele acționează ca antimetaboliți ai acidului folic, inhibând reductaza acidului dihidrofolic, deci

blocând sinteza acidului folinic, respectiv a acizilor nucleici. Administrarea acizilor folic şi folinic restabileşte această sinteză.

Fitomendiona (vitamina K_1) este antidotul specific pentru anticoagulantele orale — derivaţi de cumarină şi indantionă. Vitamina K_1 are rol de coenzimă în sinteza complexului protrombinic, implicat în coagulare. Anticoagulantele orale acţionează ca antimetaboliţi ai vitaminei K_1, încât intoxicaţia cu aceste medicamente conduce la blocarea sintezei complexului protrombinic, exprimată prin hemoragii. Administrarea de vitamină K_1 determină creşterea sintezei complexului protrombinic.

Hidroxicobalamina (vitamuna B_{12a}) este indicată în intoxicaţia cu cianuri, deoarece are mare afinitate pentru CN^-, dislocuindu-l din ciancitocromoxidază. Hidroxilul fixat pe Co din vitamina B_{12a} este înlocuit cu CN^-, rezultând ciancobalamina (vitamina B_{12}). Acţiunea antidotică a vitaminei B_{12a} este sinergică cu a tiosulfatului.

Piridoxina (vitamina B_6) este antidot fiziologic în intoxicaţia cu izoniazidă, care se însoţeşte de scăderea piridoxemiei.

Antidoturile cu acţiune indirectă sunt:

Nitritul de sodiu (sau amil) este antidot pentru CN^-. Nitritul produce methemoglobină care, având mai mare afinitate pentru citocromoxidază decât ionul cian, îl deplasează şi formează cianmethemoglobină, eliberând astfel citocromoxidaza.

Tiosulfatul de sodiu este antidot pentru CN^-, însă prin alt mecanism decât nitritul. În mod normal CN^- se detoxifică sub acţiunea rodanazei. Administrarea tiosulfatului, substratul necesar enzimei, accelerează ritmul de formare a SCN^-.

Albastrul de metilen este antidot pentru methemoglobinizante. Acestea transformă o parte de Hb (Fe^{2+}) în MetHb (Fe^{3+}) incapabilă de a transporta oxigenul. Albastrul de metilen funcţionează ca un sistem redox: el se reduce la derivatul leucometilen, care reduce apoi MetHb la Hb. Derivatul leucometilen se reface, oxidându-se prin intermediul sistemului diaforazic, având drept coenzime pe NADH şi NADPH. În acest mod se activează concomitent ciclul pentozic, dependent de aceste coenzime.

Alte sisteme redox utilizate ca antidoturi pentru methemoglobinizante sunt *tionina* şi *acidul ascorbic.*

Etanolul este antidot pentru metanol şi etilenglicol. Ambii alcooli îşi manifestă toxicitatea, în mare măsură, prin metaboliţii lor toxici. Metabolizarea are loc sub acţiunea alcooldehidrogenazei (ADH), iar aceeaşi enzimă catalizează şi metabolizarea etanolului, pentru care posedă însă mai mare afinitate decât pentru ceilalţi alcooli. Prin administrare de etanol în intoxicaţiile cu metanol şi etilenglicol, metabolizarea acestora este blocată, căci ADH este saturată de etanol.

Clorura de sodiu este antidot pentru Br^-. Fiind mai hidrosolubil decât Cl^-, ionul de brom îl înlocuieşte pe acesta din mediile biologice, rezultând fenomene toxice. Administrarea de ser fiziologic concomitent cu salidiuretice determină o diureză forţată salină, când se elimină atât NaCl cât şi NaBr, debarasând astfel organismul de Br^-.

Oxigenul hiperbar (2-3 atm) este antidot pentru CO, combătând hipoxia determinată de acesta. Acţiunea antidotică se bazează pe competiţia între CO şi O_2 pentru hemoglobină, mioglobină şi citocromi. Administrarea de O_2 100%, sub presiune, determină creşterea

cantității de O_2 solvit în plasmă, cu reducerea hipoxiei și accelerarea procesului de descompunere a carboxihemoglobinei în hemoglobină și CO.

Citocromul C este recomADNat uneori în intoxicația cu CO, deoarece întrerupe lanțul reacțiilor care conduc la hipoxie tisulară.

Pseudocolinesteraza exogenă sau plasma joacă rol de tampon fiziologic în intoxicația cu organofosforice, suplinind colinesteraza plasmatică inhibată de toxic.

Favorizarea eliminării toxicilor absorbiți. Se aplică diferite metode în funcție de natura intoxicației. Diureza forțată se recomADNă în cazul toxicilor ce se elimină, de regulă, pe cale renală. Hemodializa se aplică toxicilor dializabili, iar hemoperfuzia toxicilor absorbabili pe cărbune activat. În cazul toxicilor gazoşi și volatili se aplică ventilația mecanică, iar în cel al oxidului de carbon, oxigenoterapia hiperbară.

Tratamentul symptomatic. Măsurile de asigurare a funcțiilor vitale constituie adesea primul act din ansamblul măsurilor terapeutice de urgență.

Cap. VIII Otrăvirea cu pesticide

Pesticidele sunt substanțe utilizate pentru protejarea chimică a plantelor împotriva dăunătorilor şi pentru asigurarea stării de sănătate în cadrul bolilor transmisibile prin insecte sau alți dăunători. În funcție cu acțiunea lor principală, pesticidele se pot împărți în zece categorii: fungicide şi bactericide; insecticide; acaricide; produse cu acțiune mixtă; nematocide şi sterilizanți ai solului; rodenticide, moluscocide, repelenți; erbicide; defolianți şi desicanți; regulatori de creştere; produse auxiliare.

După gradul lor de toxicitate, exprimat prin DL_{50} mg/kg, oral, la şobolan, pesticidele se clasifică în: grupa I, extrem de toxice (sub 50 mg/kg), grupa II, toxice (50-200 mg/kg), grupa III, moderat toxice (200-1000 mg/kg) şi grupa IV, puțin toxice (peste 1000 mg/kg).

Otrăvirea cu insecticide se poate produce neintenționat prin confuzie, în majoritatea cazurilor victimele orind să consume băuturi alcoolice sau să bea apă au înghițit insecticid din flacoane neetichetate şi depozitate necorespunzător. Sunt şi cazuri de otrăvire intenționată, crimă sau sinucidere. In Evul Mediu se utiliza frecvent trioxidul de arsen (şoricioaica), utilizat ca rodenticid. Controversat este cazul Mădălinei Manole care a decedat după ingerare de furadan, un pesticid carbamic.

1. Insecticide

Otrăvirea poate fi produsă şi de insecticide diverse. Distrugerea insectelor se poate realiza cu substanțe minerale, care sunt compuşi ai As, Pb, F, Se, HCN, H_2S, PH_3, AsH_3, CS_2, precum şi compuşi organici din diferite clase.

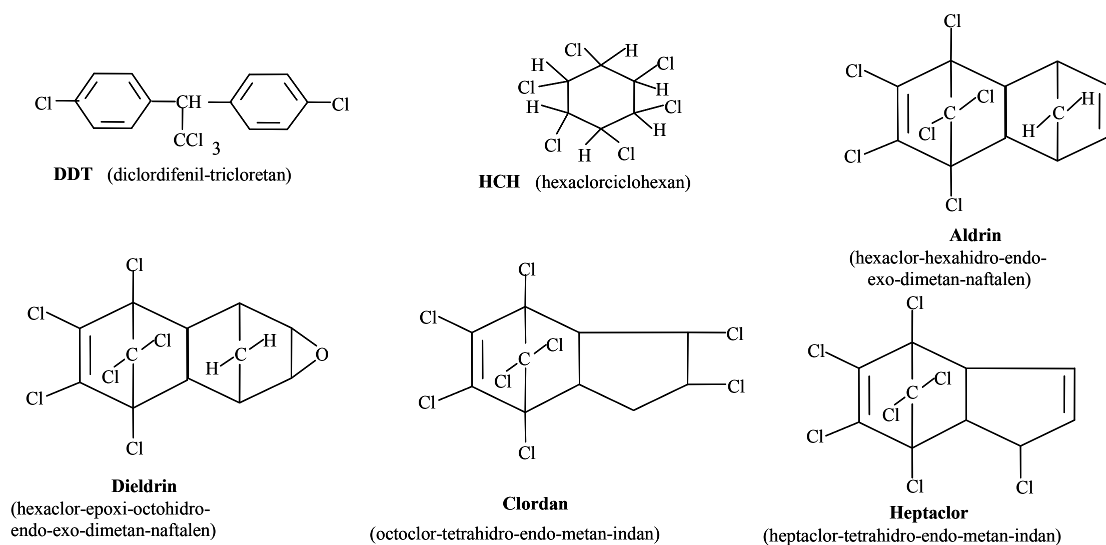
1.1 Insecticide organoclorurate

Insecticidele organoclorurate sunt derivați halogenați ai difeniletanului (DDT) şi ciclohexanului (HCH), derivați halogenați policiclici (Aldrin, Dieldrin, Clordan, Heptaclor) şi terpenici (Toxafen, Camfen policlorurat). Insecticidele organoclorurate sunt pulberi cristaline albe, inodore sau cu miros specific, insolubile în apă, solubile în solvenți organici şi lipide. Sunt utilizate sub formă de pulberi şi soluții.

Toxicocinetică. Insecticidele organoclorurate pătrund în organism pe cale respiratorie, transcutanată, digestivă. Fiind liposolubile, se localizează în țesutul adipos, ficat, măduva osoasă, creier. Se depozitează în țesutul adipos al omului, de unde se mobilizează prin pierdere ponderală bruscă, cu apariția intoxicațiilor. După biotransformare, acestea se elimină urinar lent. Sunt toxici cumulativi.

Toxicodinamie. Insecticidele organoclorurate sunt neurotoxici. Inițial provoacă excitație la nivelul SNC, cu tulburări motorii, apoi deprimanți, cu afectarea centrilor respiratori. DDT, Lindan, Aldrin şi Dieldrin provoacă tulburări cardiovasculare, în timp ce Clordan, Aldrin, Dieldrin, Heptaclor sunt hepatotoxici. Acestea prezintă un anumit potențial cancerigen. Au o mare stabilitatea şi, de aceea, lasă reziduuri în produsele alimentare sau se acumulează în grăsimea şi carnea animalelor de unde trec la om, pentru a se acumula în

lipide. Dozele letale sunt: 20 g DDT, Clordan, 7-15 g Lindan, 7 g Toxafen, 3-5 g Aldrin, Dieldrin, Heptaclor.



Diverse insecticide organoclorurate

Simptomatologie. În cazul otrăvirii cu insecticide organoclorurate, apar, inițial, semne de iritație gastrică (grețuri, vărsături, diaree), urmate de excitație nervoasă, apoi deprimare (parestezii, tremurături, cefalee, ataxie, confuzie, convulsii şi moarte prin insuficiență respiratorie). Poate apare şi fibrilație ventriculară cu moarte subită. În cazul Lindan-ului s-a semnalat şi scăderea acuității vizuale până la orbire. La derivații policiclici, fazele de excitație alternează cu cele de deprimare. Simptomatologia poate fi mascată de solvenții organici în care aceşti compuşi sunt dizolvați.

Primul ajutor. În lipsa convulsiilor se aplică spălătură gastrică şi purgativ salin. Se administrează anticonvulsivante. Sunt contraindicate: purgativele uleioase, laptele, grasimile, precum şi adrenalina (risc de fibrilație). La contaminarea tegumentelor, se spală acestea cu apă şi săpun.

Analiza toxicologică. In caz de deces, se extrag cu solvenți organici compuşii organoclorurați şi se separă şi identifică prin GC-MS. Din produsele alimentare se extrag cu acetonă, benzen, diclormetan. Identificarea se realizează prin reacțiile pentru ionul de clorură (după saponificare) sau prin reacțiile specifice fiecărui compus organoclorurat în parte. Dozarea se bazează pe nitrare, declorinare şi dozarea C_6H_6, în cazul HCH, precum şi pe gaz-cromatografie.

1.2 Insecticide organofosforice

Majoritatea insecticidelor organofosforice (peste 50 000 produse organofosforic) provoacă frecvente intoxicații acute. Tipul reprezentativ al acestei clase este Parationul.

Proprietăți. Majoritatea insecticidelor organofosforice sunt substanțe lichide, incolore sau gălbui, cu tensiune mare de vapori. Unele dintre ele posedă grupări hidrofile şi sunt solubile în apă, celelalte sunt insolubile. Sunt instabile chimic şi se descompun în prezența apei, luminii şi oxigenului. Au remanență redusă.

Toxicocinetică. Insecticidele organofosforice pătrund în organism pe cale respiratorie, transcutanată şi digestivă. Se absorb rapid şi se distribuie în ficat, rinichi, plămâni şi mai puțin în muşchi, miocard, creier, fără a se acumula. Biotransformarea se realizează prin desulfurare oxidativă (*Parationul* trece în paraoxon, iar acesta se hidrolizează în dietilfosfat şi p-nitrofenol), hidroliză cu detoxifiere (*Dipterex*), N-demetilare (*Rogor*) sau N-dezalchilare (*OMPA*). *Sistox* suferă desulfurare oxidativă, ambii izomeri formează sulfoxizi şi sulfone, mai toxici decât produşii inițiali.

Toxicodinamie. Insecticidele organofosforice îşi manifestă acțiunea toxică prin inhibarea acetilcolinesterazei (AchE), după pătrundere în fanta sinaptică. În prima etapă are loc orientarea spațială: acetilcolina se plasează cu polul său pozitiv (azot cuaternar) în dreptul centrului anionic al AchE şi cu polul negativ (gruparea electrofilă C = O) în dreptului centrului esterazic al AchE (constituit din azotul histidinei şi hidroxilul serinei). Într-o a doua etapă, se realizează apropierea şi adsorbția de suprafață, deoarece încărcătura electrică este de semn contrar; la centrul anionic se manifestă forțe van der Waals cu azotul cuaternar, iar la centrul esterazic, o legătură covalentă între C (din C = O) şi O (din OH al serinei). În etapa finală, H de la N histidinic trece pe oxigenul alcoolic, rezultând colina care, fiind slab legată la centrul anionic, se desprinde din complex. Radicalul acetil legat covalent reacționează cu apa refăcând centrul esterazic şi formare de acid acetic.

Viteza de hidroliză a acetilcolinei este foarte mare: $2 \cdot 10^{15}$ molecule pe secundă. Inhibarea AchE de către insecticidele organofosforice are loc în mod similar. Gruparea fosforică se plasează în dreptul centrului esterazic al AchE. Centrul anionic nu intră în reacție. După formarea complexului AchE─IOP, H de la N histidinic trece pe un radical al insecticidului care se elimină, iar radicalul fosforic legat covalent blochează AchE, împiedicând accesul substratului natural, acetilcolina. Aceasta se acumulează la nivelul sinapselor, cu stimularea, apoi inhibarea transmisiei sinaptice. Spre deosebire de hidroliza rapidă a acetilcolinei, hidroliza spontană a insecticidelor organofosforice cu eliberarea acidului fosforic şi regenerarea enzimei are loc extrem de lent, realizând inhibiția cvasiireversibilă a AchE.

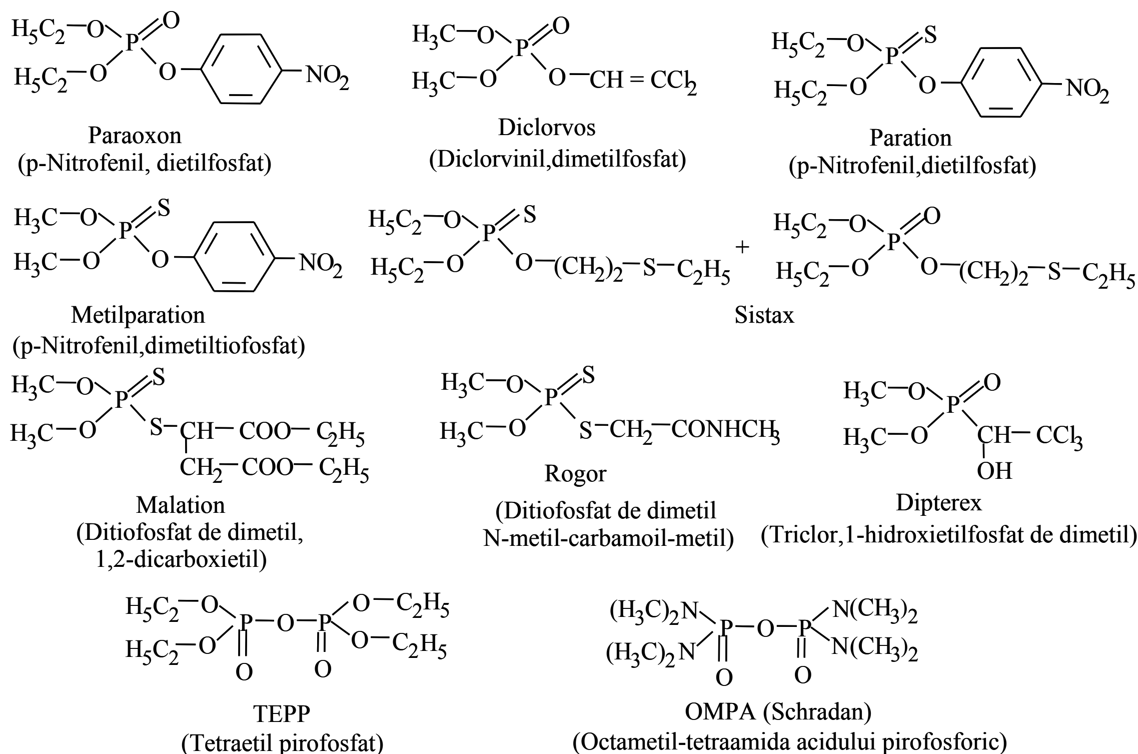
Aceste substanțe manifestă şi acțiune toxică directă asupra miocardului, exprimată prin tulburări de ritm şi conducere apărute la câteva zile după intoxicare, când starea bolnavului se ameliorease şi valorile colinesterazei plasmatice erau în creştere.

Aceste insecticide, TEPP, Paraoxon, Paration, Diclorvos, OMPA, Metilparation, Sistox (izomerul tiolo este mai toxic decât cel tiono) sunt foarte toxice. Pe de altă parte, Rogor, Dipterex sunt moderat toxice, iar Clortion şi Malation slab toxice. Dozele letale (oral) sunt de 100 mg pentru Paration şi 150 mg Metilparation.

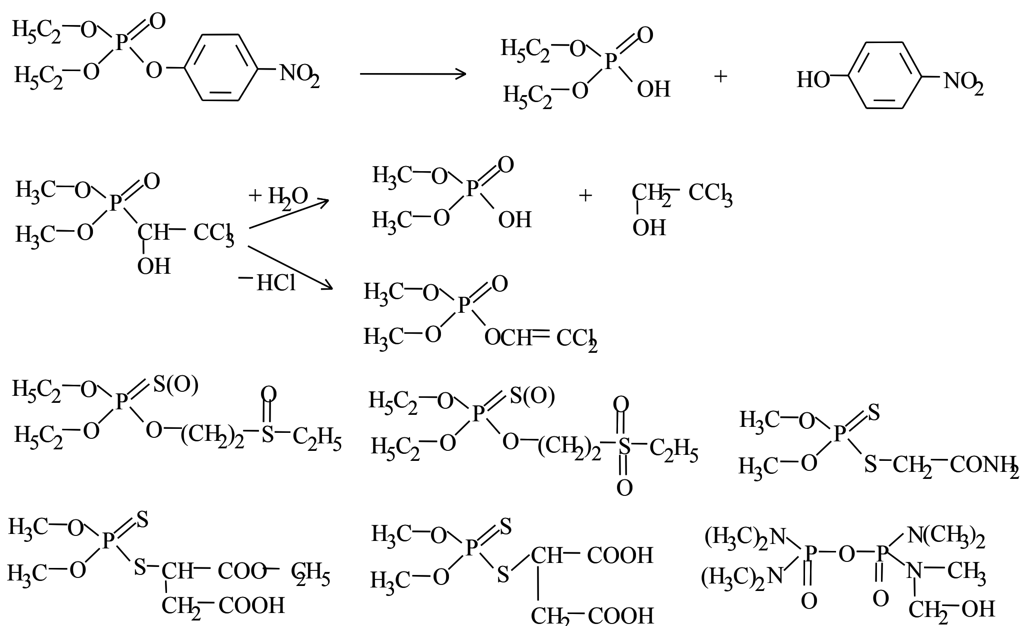
Simptomatologie. În caz de otrăvire se constată: mioză, hipersecreție glandulară generalizată, hipersecreție bronşică, tulburări digestive, hipotensiune, bradicardie, colaps,

anxietate, somnolență, convulsii şi comă. De asemenea, pot apare fibrilații musculare, convulsii tetanice şi, în cazuri grave, paralizia muşchilor respiratori.

Intoxicația cronică se exprimă prin tulburări neuropsihice (oboseală, anxietate, iritabilitate, parestezii, tremor,cefalee), digestive, opresiune toracică, mioză, transpirații.



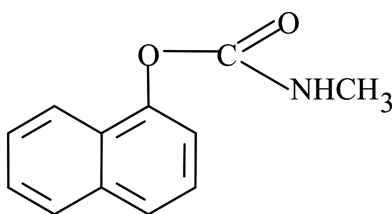
Insecticide organofosforice reprezentative



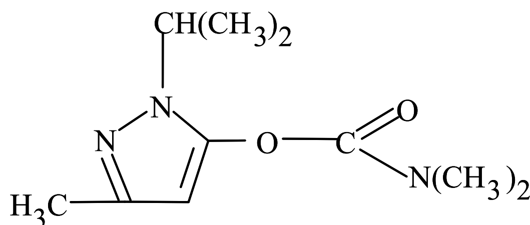
Metabolizarea unor insecticide organofosforice

Primul ajutor. Se administrează atropină şi reactivatori ai colinesterazei (PAM şi Toxogonin). Atropina se injectează imediat i.v. în doză de 1-5 mg, apoi câte 1-5 mg i.v. sau i.m. la intervale de 5, 10, 20, 30 minute, până la apariția semnelor de atropinizare (uscăciunea gurii, midriază, tahicardie). În următoarele zile se administrază s.c. 1 mg atropină la 4-6 ore. Concomitent, se administrează Toxogonin 1-6 fiole i.m. După primele doze de antidoturi se efectuează spălătura gastrică cu suspensie de cărbune activat în soluție de $NaHCO_3$ 5%, urmată de administrare de Na_2SO_4. Se tratează convulsiile. În intoxicația prin contact se îndepărtează îmbrăcămintea şi se spală tegumentele cu apă şi săpun, 15 minute. Sunt contraindicate: administrarea de lapte, purgativ uleios, medicamente deprimante ale respirației.

Analiza toxicologică. Insecticidele organofosforice se separă din mediile biologice prin metodele Stas-Otto-Ogier sau Florence (pentru sânge). Cele volatile se izolează prin antrenare cu vapori de apă. Se pot extrage şi cu solvenți organici din mediu acid. Pentru identificare, se face hidroliză în mediu acid şi oxidare; se determină P prin formare de albastru de molibden. Se pot identifica şi doza cromatografic şi spectrofotometric în U.V. şi I.R. Pentru diagnostic şi evoluția intoxicației se determină activitatea colinesterazei. Identificarea şi dozarea Parationului se bazează pe reducerea NO_2 la NH_2, apoi formarea azoderivatului sau indofenolului.



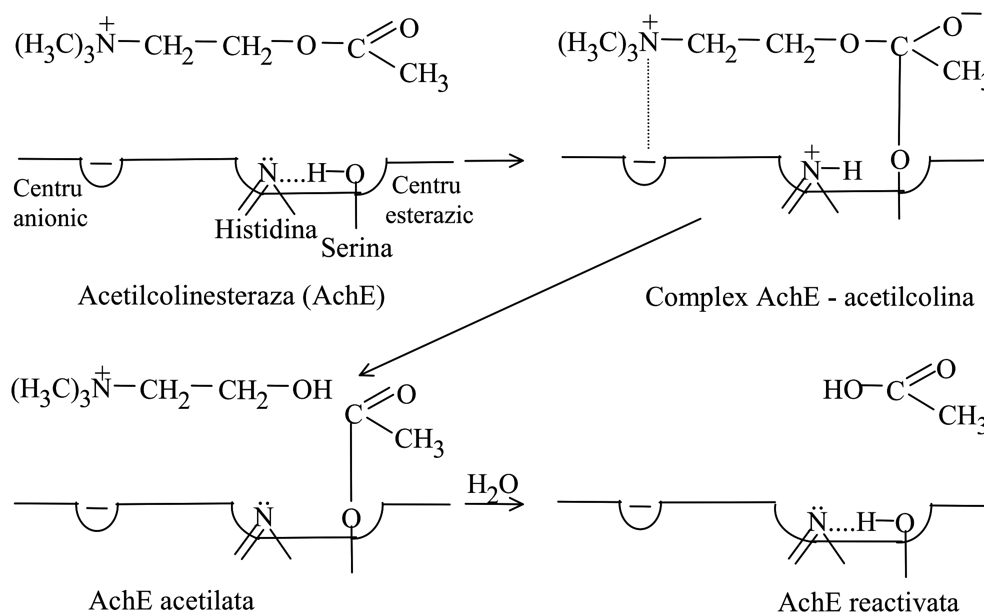
Carbaril
(metilcarbamat de alfa-naftil)

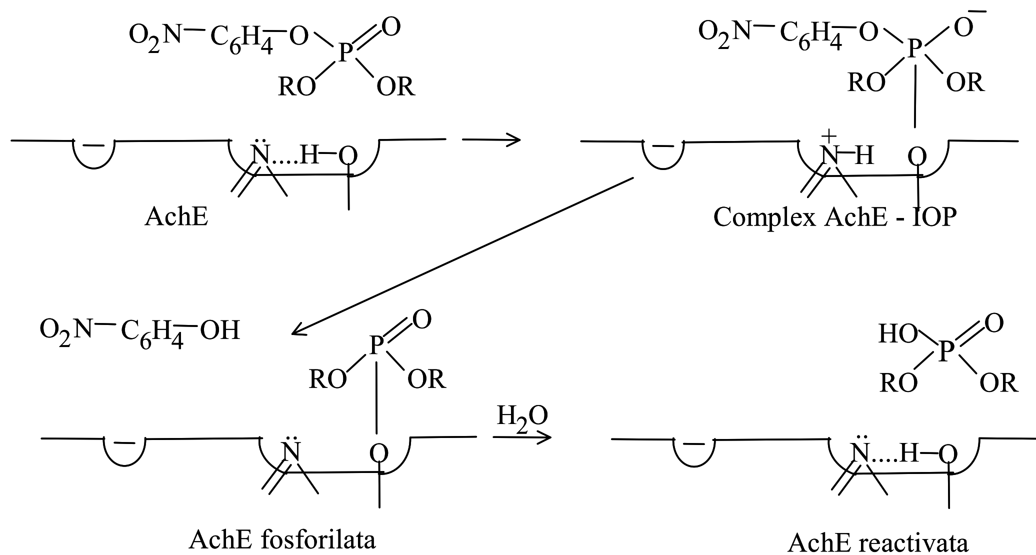


Izolan
(dimetilcarbamat de izopropil-metilpirazol)

Unele insecticide carbamice

Insecticidele carbamice sunt inhibitori ai colinesterazei, însă, spre deosebire de insecticidele organofosforice, pătrunderea în SNC este minimă, inhibarea este de scurtă durată, iar reactivarea enzimei are loc spontan. Doza letală pentru cel mai toxic compus carbamic (Izolan) este de 6 g.

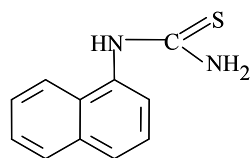




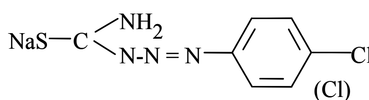
Mecanismul de toxicitate al insecticidelor organofosforice prin inhibarea acetilcolinesterazei

1.3 Rodenticide

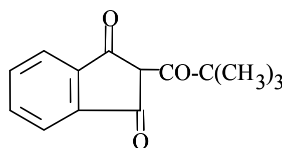
Pentru distrugerea rozătoarelor şi a altor vertebrate dăunătoare se utilizează substanțe vegetale (*Scilla maritima*), minerale(fosforul alb, fosfuri de zinc sau aluminiu, derivați de arsen, săruri de bariu sau taliu) şi organice (stricnină, veratrină, produşi de sinteză).



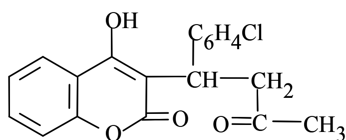
ANTU
(alfa-naftiltiouree)



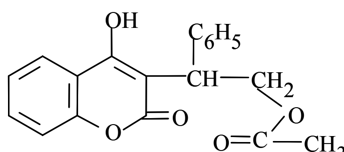
Promurit
(p-clor-fenildiazotiouree)
Clorpromurit
(3,4-diclor-fenildiazotiouree)



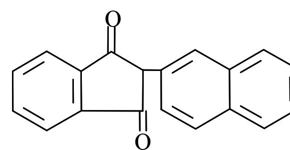
Pival
(2-pivaloil-1,3-indandiona)



Cumaclor
3-(alfa-clorfenil-beta-acetiletil)-
-4-hidroxicumarina



Warfarina
3-(alfa-fenil-beta-acetiletil)-
-4-hidroxicumarina



Nidan
(2-naftil-1,3-indandiona)

Exemple de rodenticide utilizate pentru uciderea rozătoarelor

Derivații de tiouree sunt slab toxici la om. La ingerarea unei mari cantități de substanță poate surveni moartea prin insuficiență respiratorie sau cardiovasculară. În intoxicația acută se recomandă administrarea $Na_2S_2O_3$ soluție 10%, 10 ml i.v.

Anticoagulantele de sinteză (Warfarină, Cumaclor, Pival, Nidan) se comportă ca antimetaboliți ai vitaminei K; urmare a blocării sintezei complexului protrombinic, scade protrombina cu apariția hemoragiilor. Antidotul este vitamina K_1 (fitomenadiona), 50-100 mg i.v., lent, în primele 24 ore.

Fluoroacetatul de sodiu, FCH_2—COONa, determină, prin sinteză letală, formarea de acid fluorhidric, cu manifestări toxice determinate de inhibarea ciclului Krebs şi spolierea organismului de Ca^{2+}. Antidotul este glicerolmonoacetatul (Monoacetin), donor de acetat.

Analiza toxicologică. ANTU se extrage cu $CHCl_3$, se hidrolizează alcalin şi se identifică naftilamina rezultată prin reacția Griesz. Warfarina se extrage cu $CHCl_3$ în mediu acid, se nitrează, se reduce NO_2 la NH_2, se diazotează şi se cuplează. Fluoroacetatul se identifică, după hidroliză alcalină, prin F^- rezultat.

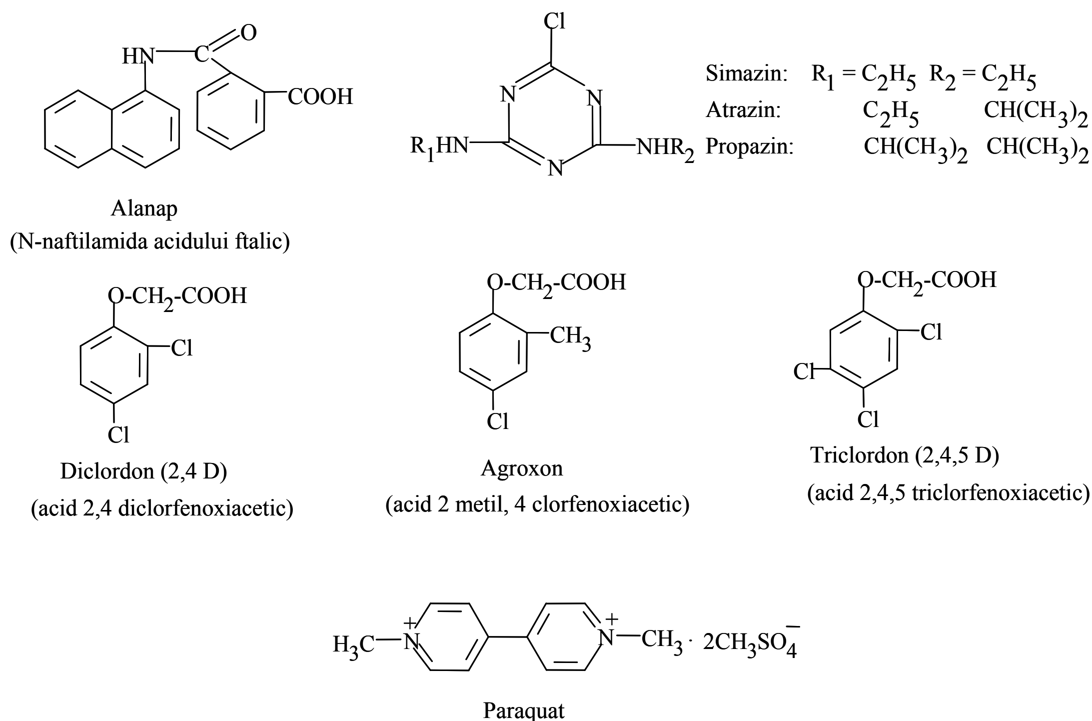
1.4 Erbicidele

Sunt substanțe minerale ($NaClO_3$, $CaCN_2$, $CuSO_4$, NH_2—SO_2—ONH_4, $Na_2B_4O_7$, $NaBO_2$) şi organice utilizate la distrugerea buruienilor, fără afectarea plantelor utile.

Ariloxiacizii (Diclordon, Agroxon, Triclordon) interferă în metabolismul glucidelor, cu manifestări la nivelul sistemului nervos, miocardului, ficatului şi rinichilor. Sunt toxici cumulativi. Doza letală este de 6 g.

În intoxicația acută se recomandă spălătura gastrică şi tratament simptomatic.

Derivații ureici provoacă intoxicații acute (tulburări digestive, neurologice şi hepatorenale) şi cronice (cefalee, astenie, dermatoze, agranulocitoză). Cel mai toxic reprezentant al clasei este tioureea, care prezintă şi proprietăți abortive.



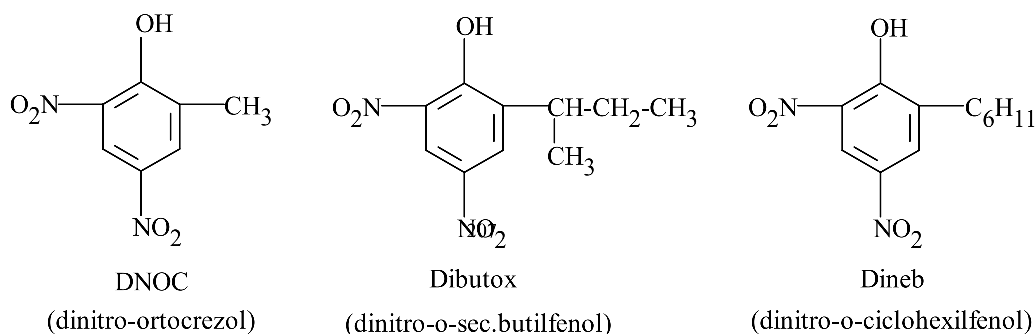
Erbicide utilizate în agricultură la distrugerea buruienilor

Derivații ftalici (Alanap; doza letală= 1 g) determină leziuni corozive pe tractul gastrointestinal, cu simptomatologie şi tratament ca la acizii corozivi.

Diazinele şi triazinele (Simazin, Atrazin, Propazin) sunt lipsite de toxicitate şi nu sunt iritante.

Paraquatul (metilsulfat de 1,1',4,4' dipiridiniu) acționează toxic prin legare de acizii nucleici şi mucozaharidele intercelulare.

1.5 Insecticidele dinitrofenolice. Dinitrofenolii (DNOC, Dibutox, Dinex) sunt toxici celulari, decuplanți ai fosforilării oxidative, cu scăderea formării de ATP. Ca urmare, energia nu mai este stocată, ci risipită sub formă de căldură, consumul de oxigen este mărit, iar mitocondriile

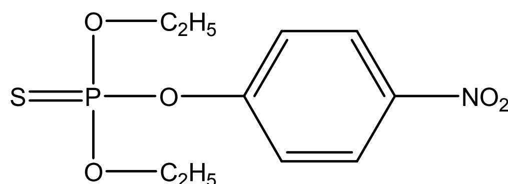


miocardului, muşchilor scheletici, ficatului, rinichilor, sunt lipsite de energia stocată de obicei în ATP. Doza letală este de 1-3 g; pot determina intoxicații grave prin acumulare.

Primul ajutor constă din spălătură gastrică cu $NaHCO_3$ soluție 5% şi purgativ salin, combaterea hipertermiei (băi reci), combaterea convulsiilor, oxigenoterapie, aport de lichide.

1.6 Toxicologie de laborator

Determinarea parationului



A. Izolare

Parationulse izolează din mediul acid cu solvenți organici. Fiind volatili, poate fi izolat şi prin antrenare cu vapori de apă.

a. Izolare din urină: se aciduleazǎ 25-50 ml urină cu acid clorhidric 10% şi se extrag de minimum m 2 ori cu volume egale de eter etilic. Extractele organice reunite sunt filtrate printr-un filtru uscat. Filtratul este evaporat la sec pe baia de apă.

b. Izolare din sânge: se tratează 5-10 ml sânge cu 5-10 ml acid tricloracetic 20%. Se filtrează, iar filtratul se extrage de minimum 2 ori cu câte 20 ml eter etilic. Extractele eterice reunite sunt filtrate printr-un filtru uscat. Filtratul este evaporat la sec pe baia de apă la 50°C.

c. Izolare din conținut stomacal: se triturează 5-10 ml conținut stomacal cu sulfat de sodiu anhidru, până la obținerea unei mase pulverulente. Se extrage masa cu o cantitate dublă de eter de petrol. Extractul este evaporat la sec.

d. Izolare din organe: se extrag 20 g organe prin metoda Stas-Otto-Ogier. Parationul şi p-nitrofenolul-principalul sau metabolit-se regăsesc în eterul acid.

c. Izolare din produse alimentare sau corpuri delicte: se extrage o cantitate din produsul de analizat cu un volum egal de alcool etilic, într-un borcan cu dop rodat, timp de 20 minute. Se decantează şi se filtrează extractul alcoolic într-un balon cotat de volum corespunzător şi se completează la semn cu alcool etilic.

B. Identificare

1. Teste preliminare

a. Din conținut stomacal:

1. Se încălzeşte pe baia de apă o cantitate de conținut stomacal cu volum dublu de alcool etilic absolut. Se filtrează pe sulfat de sodiu anhidru şi se evaporă filtratul la sec. Se tratează reziduul cu 1-2 ml hidroxid de sodiu 20% şi se fierbe câteva minute. Prin hidroliză se eliberează p-nitrofenolul, care în mediul alcalin, prezintă o colorație galbenă, p-nitrofenolat de sodiu, iar la acidulare, colorația dispare – p-nitrofenol.

2. Se concentrează, prin evaporare pe baia de apă, o cantitate de conținut stomacal până la 1/4 din volumul său. Se tratează cu 1 ml perhidrol şi se încălzeşte din nou. După distrugerea, pe această cale, a substanțelor organice care ar deranja reacția, se alcalinizează cu hidroxid de sodiu 20% şi se fierbe câteva minute, când apare o colorație galbenă.

b. Din sânge şi urină: se deproteinizează 2-5 ml sânge sau 5-10 ml urină cu acid tricloracetic 20%. Se filtrează, se alcalinizează filtratul cu hidroxid de sodiu 20% şi se fierbe câteva minute, când apare colorația galbenă.

2. Reacții de culoare

a. Reacția Averell-Norris: reziduul se tratează cu 2 ml acid tricloracetic 10%. Se trece într-o eprubetă şi se adaugă 1-2 granule de zinc amalgamat. Se încălzeşte 5-10 minute pe baia de apă la fierbere. Se filtrează, se răceşte, se adaugă 0,2 ml nitrit de sodiu 0,1%. Se agită şi se lasă în repaus 15 minute. Se adaugă 0,2 ml N-naftiletilen-diamină (NKD) 0,1%, când apare o colorație violetă.

b. Reacția de formare a derivaților chinoniminici:

1. Reziduul se tratează cu 2 ml hidroxid de sodiu 5% şi 0,5 g aliaj Dewarda (10 p.Cu, 9p.Al, 1p.Zn, reducător în mediul alcalin, prin hidrogenul în stare născândă pe care-l degajă), când se formează prin reducerea p-nitrofenolului. Se adaugă după 15 minute, 0,5 ml ortocrezol 1% în alcool şi 1-2 ml apă oxigenată. Se obține prin cuplarea p-nitrofenolului cu o- crezolul, un derivat chinonimic deculoare albastră.

2. Reziduul se tratează cu 2 ml hidroxid de sodiu 5%. Se adaugă câteva cristale de ditionit de sodiu, $Na_2S_2O_2$. După câteva minute se distruge excesul de ditionit cu acid clorhidric 10% , apoi se adaugă 1 ml alfa-naftol 1% în alcool, sau 1 ml oxină (S-hidroxichinolină) 1% în alcool şi 1 ml perhidrol. Se alcalinizează la pH = 8-9 cu hidroxid de sodiu 10% . Se obține, prin cuplare p-nitrofenolului cu alfa-naftol sau oxina, un derivat chinoniminic de culoare albastră.

c. reacția de formare a p-nitrofenolatului de sodiu se tratează reziduul cu câteva picături de perhidrol si 3-5 ml hidroxid de sodiu 20%. Se încălzeşte, pe baia de apă, la fierbere , 15 minute. Prin hidroliză în mediul alcalin se formează p-nitrofenolatul de sodiu de culoare galbenă.

Soluția se decolorează prin acidulare.

3. Cromatografie pe strat subțire

Suportul: plăci cu silicagel G activate 20-30 minute la 110°C .

Spotarea: reziduul se reia cu 0,2-0,3 ml acetonă.

Martori: paration, malation în 0,2-0,3 ml acetonă.

Sistemul de developare: eter de petrol: acetonă (75 : "5).

Revelarea: - expunerea plăcii în lumină Wood – spoturi galbene

pulverizare cu:

a. soluție de iod 0,1 N ce conține 3% azidă de sodiu. se obțin spoturi albe pe fond galben;

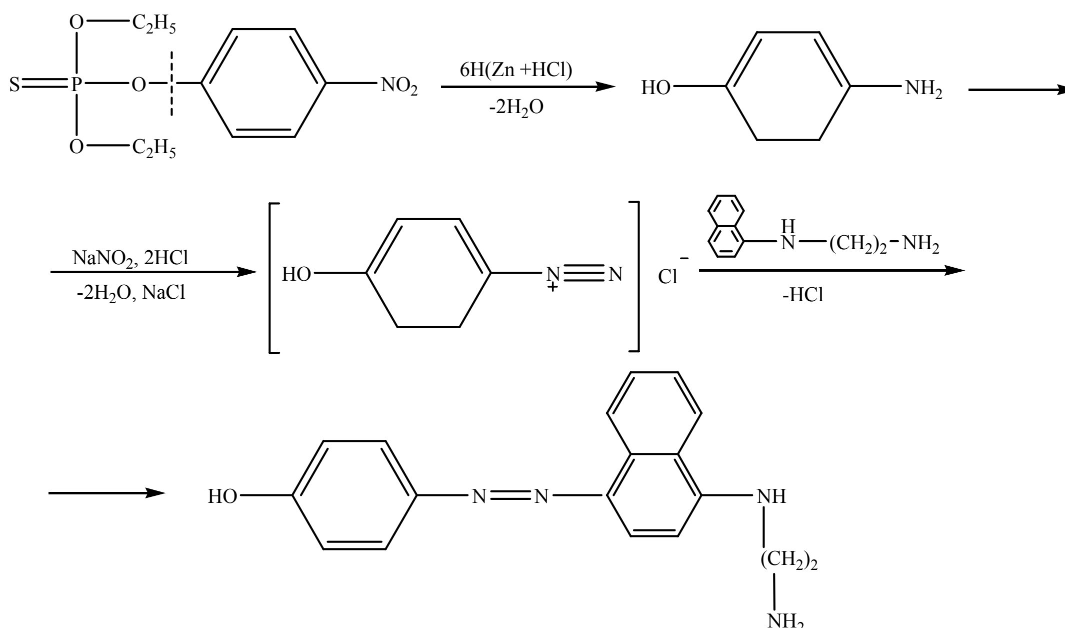
b. expunere 10 minute la vapori de brom. Se pulverizează cu o soluție de clorură ferică 0,1% în etanol 80°. Se usucă şi după 15 minute se pulverizează cu soluție de acid sulfosalicilic 1% în etanol 80°. se obține spoturi albe pe suport violet.

1. Dozarea cu azoderivat. Metoda Averell-Norris.

a. Pentru aer

Principiu:

Gruparea nitro din paration este redusă la gruparea amino. Aceasta se diazotează, iar clorura de diazoniu se cuplează cu N-naftil-etilendiamină (NKD), rezultând un azoderivat violet, colorimetrabil. Sensibilitatea metodei este de 0,1 ml paration/m^3 aer.



Reactivi:
1. alcool etilic 96°.
2. Acid clorhidric N.
3. Zinc pulbere.
4. Sulfat de cupru 2%.
5. Nitrat de sodiu 0,1% (soluția se conservă maximum o săptămână la frigide).
6. Sulfamat de amoniu 5%)soluția se conservă maximum două săptămâni la frigider).
7. N-naftiletilendiamină 1%.
8. Soluție standard stoc. Se cântărețte un balon cotat 100 ml care conține 10 ml alcool etilic. (A g). Se adaugă 3 picături de paration şi se recântăreşte balonul (B g). Se completează la semn cu alcool etilic. Conținutul în paration va fi: mg paration/ml = 10(B-A).
9. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu alcool etilic, astfel ca 1 ml = 40 micrograme paration.

Recoltarea probelor

Într-o alonjă de recoltat pulberi se aşează, în ordine, începând de la capătul său îngust, următoarele: un tampon de vată un strat de 0,5 g pulbere celuloză care se tratează până la uniformizarea stratului; un strat format dintr-un amestec de 0,5 g şi 0,1 g pulbere de zinc, de asemenea tasat uşor, un al doilea tampon de vată pentru menținerea poziției stratului de pulbere de celuloză şi zinc.

Alonja astfel pregătită se conectează la o pompă de vid şi se aspiră, cu un debit de 5 litri/minut, un volum de aer care să conțină, în medie, 20 μg paration (100-200 litri aer).

Modul de lucru

Se montează alonja cu proba recoltată într-un stativ, cu ajutorul unei cleme, în poziție verticală. Se prepară un amestec din 10 ml alcool etilic, 10 ml acid clorhidric N şi 2 picături sulfat de cupru 2%. Se adaugă acest amestec peste stratul de pulbere de celuloză, culegându-se 10 ml cluant într-o eprubetă gradată de 30 ml. În aceeaşi eprubetă se adaugă: 1 ml nitrit de sodiu 0,1% se agită şi se lasă în repaus 15 minute; 1 ml sulfamat de amoniu 5% ; se agită şi se lasă în repaus 15 minute; se dizolvă 1 ml NKD şi se completează cu apă distilată la 15 ml.

Se citeşte extincția după 15 minute, la spectrofotometru, la λ = 550 nm, în cuva de 1 cm, față de amestec alcoolic: HCl N(1 : 1).

Curba de etalonare se întocmeşte între 0 şi 20 µg, procedând astfel: într-un balon Erlenmayer de 100 ml se aduc 10 ml soluție standard în lucru, apoi 2 picături sulfat de cupru şi maximum 100 mg pulbere de zinc. Se agită 5 minute şi se filtrează pe hârtie de filtru . Se spală precipitatul de pe filtru cu un amestec, cu volume egale de HCl N şi alcool etilic, colectând peste filtrat, până la obținerea a 40 ml soluție. Această soluție conține parationul redus, 1 ml = 10 µg paration. Din soluție se iau, în 5 eprubete de câte 30 ml: 0,5; 1,0: 1,5; 2,0 ml. Se completează la 10 ml cu amestec de alcool etilic: HCl N (1 : !). În continuare , se adaugă nitrit 0,1%, sulfat 5% şi NKD 1% ca la probe şi în aceleaşi condiții, se citesc extincțiile.
Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba etalon, obținându-se concentrația "C" a parationului, în µg, în probă.
Calcul:
Rezultatele se exprimă în mg paration la m^3 aer:
în care:
C = concentrația parationului, în µg;
V = volumul de aer recoltat, în litri.
Observații:
1. Metoda nu este specifică, purtând interfera o serie de nitro- şi aminoderivați aromatici, prezenți ca impurități alături de paration,
2. Etaloanele se pot prepara şi dintr-o soluție de p-nitrofenol cu concentrațiea exprimată în paration.
Normele republicane aflate în vigoare prevăd pentru paration CMA de 0,15 mg/mc aer.
b. Pentru produsele biologice, corpuri delicte.
Principiu:
(Acelaşi ca în metoda pentru aer)
Modul de lucru:
Reziduul obținut prin extracție cu solvenți organici (v. izolarea a, b, c, d) se dizolvă în câțiva mililitri etanol de 96° şi de trece cantitativ într-un balon cotat de 10 ml. Se iau într-o eprubetă 2 ml din soluția alcoolică şi se adaugă 2 ml acid clorhidric 10%, 0,2 g zinc pulbere, o picătură sulfat de cupru 2%. Se lasă 10 minute, agitând periodic. Se pregăteşte un filtru umectat cu amestec alcool etilic : acid clorhidric N (1 : 1) şi se filtrează conținutul eprubetei, culegându-se filtratul într-o eprubetă gradată de 10 ml. Se spală filtratul cu 1 ml amestec alcool : HCl (1 : 1) care se colectează tot în eprubetă. Se adaugă în eprubetă: 0,1 ml nitrit 0,1% se agită şi se lasă în repaus 15 minute, 1 ml sulfamat, se agită şi se lasă în repaus 15 minute, 0,5 ml NKD 1%, se agită şi se aduce la 10 ml amestec alcool : HCl 1 N (1 : 1). Se citeşte extincția după 15 minute, la spectrofotometru, la λ = 550 nm în cuva de 1 cm, față de un martor al reactivilor.
Curba de etalonare se întocmeşte între 10 şi 50 µg paration, prin puncte din 10 în 10, în condițiile descrise mai sus.
Valoarea extincției pentru probe se raportează la curba etalon, apoi se înmulțeşte cu 5 – deoarece s-a lucrat cu 1/5 din probă – obținându-se concentrația C a parationului, în µg, în probă.

Concentrația probei necunoscute se poate calcula şi cu ajutorul factorul pantă.

Eprubeta						
Reactivi(ml)	1	2	3	4	5	6(M)

Standard de lucru	0.25	0.50	0.75	1.0	1.25	-
Conc. µg	10	20	30	40	50	-
Etanol 96º	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Acid clorhidric 10 %	2.0					
Zinc pulbere	0,2g					
Sulfat de cupru 2%	1 picătură					
10 minute repaus.Filtrare						
Nitrit de sodiu	0.1-agitare, 15 minute repaus					
Sulfat de amoniu	1,0 se agită 15 minute repaus					
NED 1%						
Amestec alcool: acid clorhidric (1:1)	0.5 agitare					
Extinc□ia	λ=500nm					

Calcul

Rezulatele se exprimă înmg paration la 100 ml (g) sânge sau organe şi la 1000ml urină sau conținut stomacal :

mg paration/100ml(g)sânge,organe = C / loA

mg paration/100ml(g)urină,con□inut stomacal = C / A

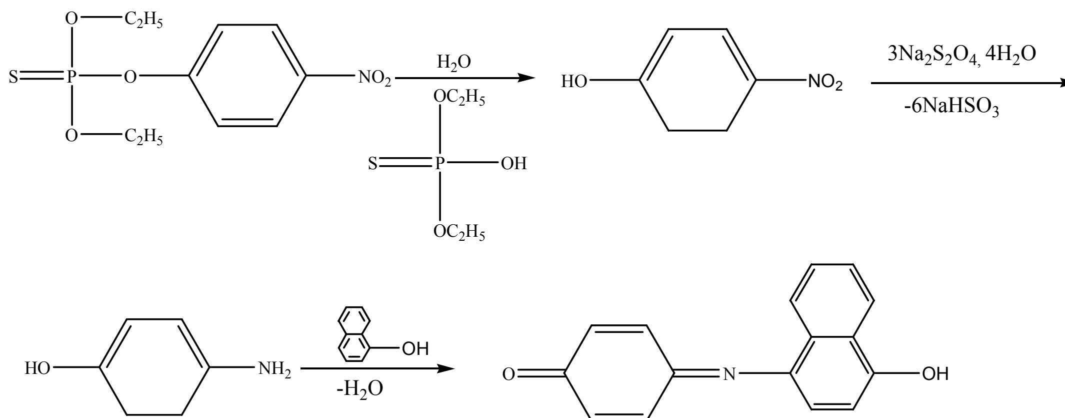
în care: C= concentra□ia parationuli, în µg

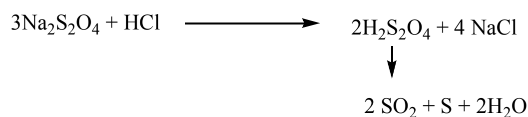
A =masa (volumul) de produs luat în lucru, în g/ml

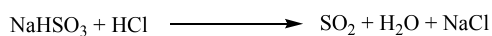
2. <u>Metoda spectroscopică (formarea unui derivat chinoniminic)</u>

Principiu:

Parationuleste hidrolizat la p-nitrofenol. Acesta este redus cu ditionit, sau aliaj Dewarda, la p-aminofenol. P-aminofenolul este cuplat cu alfa – naftolul sau oxina, în mediu alcalin, cu formarea unui derivat chinoniminic de culoare albastră. Sensibilitatea este de 1 µg/ml







Reactivi:
1.Hidroxid de potasiu 10%.
2. Acid clorhidric 10%.
3. Ditionit de sodiu (hidrosulfit de sodiu).
4.Eter etilic.
5. Sulfat de sodiu
6. Alfa naftol 1% în 5%.
7. Soluții standard de lucru 1 ml = 100µg (v. paration). Soluție standard de lucru se prepară cu p-nitrofenol dar cu concentrația exprimată în paparation.
Modul de lucru:
Reziduul obținut de la extragerea cu solvenți organici este dizolvat în 10 ml hidroxid de potasiu 10%. Se încălzeşte 15 minute pe baia de apă la fierbere, se răceşte şi se aduce cantitativ (prin reluări cu apă distilată) într-o pâlnie de separare. Se acidulează cu HCl 10% şi se extrage de 3 ori cu câte 20ml eter etilic. Fazele eterice reunite se filtrează pe sulfat de sodiu anhidru într-o capsulă. Se evaporă sub nişă la temperatura laboratorului. Reziduul se aduce cantitativ cu mici porțiuni de hidroxid de potasiu 10% (2 ml) într-o eprubetă gradată (10 ml) se adaugă un vârf de spatulă de ditionit de sodiu, se agită şi se fierbe 10 minute Se răceşte proba şi se adaugă 1 ml acid clorhidric 10% (pentru distrugerea excesului de ditionit sodiu şi a sulfului acid) se agită şi se lasă 5 minute în repaus.Se adaugă 1 ml hidroxid de potasiu 10% şi 1 ml alfa naftol 1% în hidroxid de potasiu 5%.
Se aduce cu apă distilată la 5 ml. Se citeşte extincția după 15 minute la spectrofotometru, λ = 610 nm, în cuva de 1 cm, față de un martor al reactivilor.

Curba de etalonare se întocmeşte între 20 şi 100 µg paration, prin puncte din 20 în 20 în condițiile descrise mai sus.

Eprubeta						
Reactivi(ml)	1	2	3	4	5	6(M)
Standard de lucru 100 mg paration/ml	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	-
Conc.µg	20	40	60	80	100	-
KOH 10%	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	2.0
Ditionit de sodiu	un vârf de spatulă					
Acid clorhidric 10%	1.0-agitare, 5 minute repaus					
Hidroxid de potasiu 10%	1.0-agitare					
Alfa naftol 1% în KOH 5 %	1.0-agitare 15minute repaus					
Extinc□ia	λ=610nm					

Valoarea extincției pentru probe se r4aportează la curba etalon, obținându-se concentrația C a parationului, în µg, în probă.

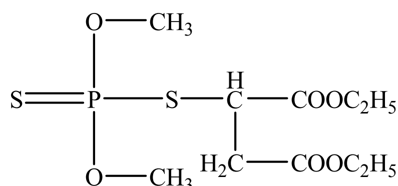
Calcul:
(v. metoda precedentă).
Observații:
1. Cuplarea se poate face în aceleaşi condiții şi cu oxină (8 hidroxchinolină) 0,1% în alcool.
2.Reducerea p-nitrofenolului la p-aminofenol în mediul alcalin poate fi făcut şi cu aliaj Dewarda.
Scara etalon în acest caz este efectuată astfel:

Eprubeta						
Reactivi(ml)	1	2	3	4	5	6(M)
Standard de lucru 100 mg paration/ml	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	-
Conc.µg	20	40	60	80	100	-
KOH 10%	4.8	4.6	4.4	4.2	4.0	5.0
Aliaj Dewarda	un vârf de spatulă,2o minute repaus,se agită. Filtrare					
Alfa naftol 1% în KOH 5 %	1.0-agitare 15minute repaus					
Extinc□ia	λ=610nm					

Interpretarea rezultatelor

Doza letală de paration, la om, se înscrie între 20 şi 100mg. pătrunderea în ochi a 0,5 ml paration poate fi fatală. În mai multe cazuri de intoxicație severă s-au găsit valori urinare de p-nitrofenoli de 1,6 mg/litru până la 11,6 mg/litru. În 19 cazuri fatale s-au decelat următoarele valori medii şi extreme de paration: 9 (0,5 – 34) mg /100 ml sânge; 10 (0,4 – 76) mg/litru urină; 11 (0,1 - -120) mg/kg ficat.

DETERMINAREA MALATIONULUI



A. Izolare:

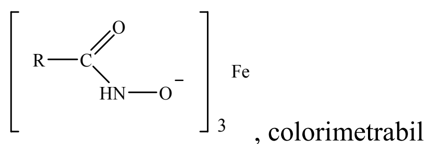
Malationul se izolează din mediu acid cu solvenți organici (eter etilic, cloroform) după tehnicile indicate de paration, din: produse biologice, produse alimentare, corpuri delicte.

B. Dozare:

1. Metoda spectrofotometrică (formarea complexului hidroxamat – Fe^{3+})

Principiu:

Malationul, conținând gruparea carbonil, reacționează cu hidroxilamina în mediul alcalin, cu formare de hidroxamați , care cu clorura ferică dau un complex roşu, de tip Hantzsch, de forma



, colorimetrabil

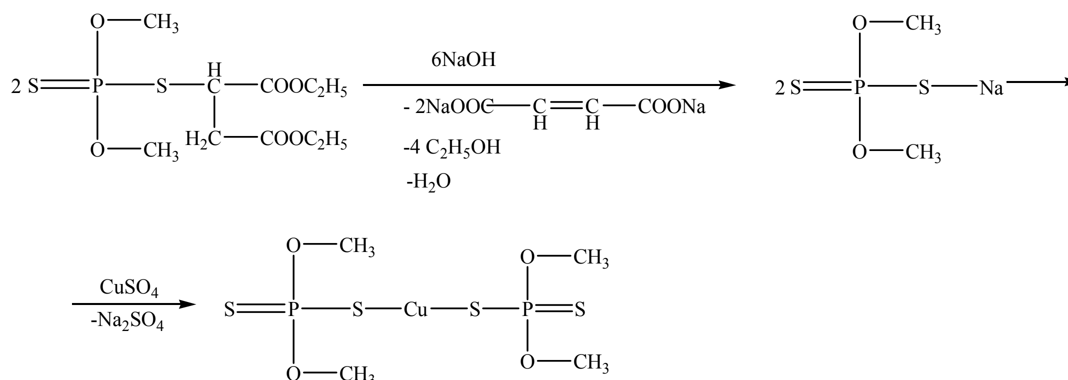
Sensibilitatea metodei este de 10 µg/ml. Metoda este comună esterilor acetici.

Reactivi:

1.Alcool etilic 95°.
2. Hidroxilamină clorhidrică 20% (se poate conserva maximum două săptămâni la frigider, însă este preferabil să se prepare extemporaneu).
3.Hidroxid de sodiu20%.
4.Acid clorhidric 50% (v/v).
5. Clorură ferică 12%. Se dizolvă 12 g $FeCl_3 . 6H_2O$ în 100 ml HCl 0,1N.
6. soluție standard stoc. Se aduc 0,5 g malation la 100 ml cu alcool etilic. 1ml = 5 mg.
7. Soluție standard de lucru. Se diluează soluția standard stoc cu alcool etilic în proporție de 1 : 50. 1 ml = 100 µg malation.
Modul de lucru
Reziduul de la extragerea cu eter (cloroform) este adus într-o eorubetă gradată de 20 ml cu alcool etilic 95°. Se aduagă 2 ml hidroxilamină 20%. Se lasă în repaus 5 minute şi se adaugă 2,5 ml acid clorhidric 50% şi 1 ml clorură ferică 12% apoi cu apă distilată 15 ml. Se citeşte extincția probei la spectrofotometru, la λ = 500nm, în cuva de 1 cm, față de un martor al reactivilor.
Curba de etalonare se întocmeşte între 20 şi 100 µg malation prin puncte din 20 în 20 în condițiile descrise mai sus.

Eprubeta						
Reactivi(ml)	1	2	3	4	5	6(M)
Standard de lucru 100 mg malation/ml	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	-
Conc.µg	20	40	60	80	100	-
Alcool etilic 95º	4.8	4.6	4.4	4.2	4.0	5.0
Hidroxilamină 20%	2.0					
Hidroxid de sodiu 20% 2.0-agitare, 5 minute repaus						
Acid clorhidric 50%	2.5					
Clorură ferică 15%	1.0-agitare					
Apă distilată ad 15						
Extincția λ=500nm						

Valorile extincției pentru probe se raportează la curba etalon, obținându-se concentrația C a malionitului, în µg, în probă.
Calculul:
rezultatele se exprimă în mg malation/100 mg (g) sau mg malation/100 ml (g) produs de analizat
mg malation/100ml(g) produs analizat = C / 10A
mg malation/100ml(g) produs analizat = C / A
în care:
C = concentrația malationului, în µg
A = volumul (masa) de produs luat în lucru, în mg (g).
2. Metoda spectrofotometrică (formarea dimetilditiofosfatului de Cu^+
Principiu:
Prin hidrolizarea malationului în mediul alcalin rezultă dimetilditiofosfatul de sodiu care formează cu Cu^+, dimetilditiofosfat de cupru de culoare galbenă extractibil în tetra cloruă de carbon.
Sensibilitatea metodei este de 10µg/ml.



Reactivi:
1.Hidroxid de sodiu 6 N.
2.Clorură ferică 0,2%. Se dizolvă 0,2 g clorură ferică în câțiva mililitri apă, se adugă 10 ml acid clorhidric concentrat şi se completează la 100ml cu apă.
3. Fenoftalină1% în alcool.
4. Acid clorhidric 5N.
6. Tetraclorură de carbon.
7. Soluție standard (v. metoda precedentă)..

<u>Modul de lucru</u>:

Reziduul de la extragerea cu solvenți organici este tratat cu 1 ml hidroxid de sodiu 6 N şi 25 ml clorură ferică 0,2%. se agită şi se lasă în repaus 5 minute, apoi se neutralizează cu acid clorhidric în prezența de fenolftaleină. Se aduce cantitativ într-o pâlnie de separare, se adaugă 2 ml sulfat de cupru 1% şi se extrage de două ori cu câte 5 ml tetraclorură de carbon. Extractele organice reunite se configurează. Se citeşte extincția la spectrofotometru, λ = 470 nm, în cuva de un cm, față de tetraclorura de carbon.

Curba de etalonare se întocmeşte între 20 şi 100 µg malation, prin puncte din 20 în 20, în condițiile descrise în scara etalon.

Eprubeta						
Reactivi(ml)	1	2	3	4	5	6(M)
Standard de lucru 100 mg malation/ml	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	-
Conc.µg	20	40	60	80	100	-
Hidroxid de sodiu 6 N	1.0					
Clorură ferică 0.2%	25.0 se agită,repaus 5minute					
Hidroxid de sodiu 20%	2.0-agitare, 5 minute repaus					
Neutralizarea cu acid clorhidric 5N în prezen□ă de fenoftaleină 1 % în alcool						
Sulfat de cupru 1%	2.0					
Tetra clorură de carbon	5.0 se extrage de 2 ori					
Se centrifughează extractele reunite						

Se citeşte extincția la Spekol, λ = 470 nm, în cuva de 1 cm, față de tertraclorura de carbon.

Valoarea extincției pentru probe se raportează la curba de etalon, obținându-se concentrația C a malanitului, în µg, în probă.

Calcul: (v. metoda precedentă).

Interpretare rezultatelor:

Doza latentă medie de malation la om, este apreciată la 60 grame. Ingerarea de 14 g a determinat,la adult, simptome de intoxicație severă. În 4 cazuri fatale prin ingerare de 25 – 70 g malation, în scop de sinucidere, s-au decelat următoarele valori medii şi extreme; 815 (100-18807) mg/ml sânge; 1215 (200 – 1700) mg/kg ficat.

DETRMINAREA ACTIVITĂȚII COLINESTERAZICĂ

A. Teste orientative

1. testul cu albastru de brom timol

a. Se impregnează o bandă de hârtie de filtru, în soluție de acetilcolină 0,o1 M, apoi în soluție de albastru de brom timol =,1% în alcool. Se spotează 1 - 2 picături de ser de analizat, proaspăt. Se apreciază activitatea colinesterazică după tipul de modificare a culorii spotului, astfel: activitatea normală, 7 - 18 minute; activitatea scăzută, 35 - 150 minute.

b. Testul cu acid 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoic.

- În conținut stomacal: în două eprubete, M şi P, de introduc:

Eprubeta/ reactivi	M	P
Solu□ie de acid ditio-bis-nitrobenzoic(ml)	3	3
Iodură de acetilonă 5% (ml)	0.1	0.1
Apă distilată (ml)	0.2	-
Con□inut stomacal filtrat (ml)	-	0.2

Se lasă în repaus 2 minute. Absența unei diferențe de culoare între cele două eprubete indică prezența compuşilor organofosforici sau altor inhibitori şi colinesterazei.

Soluție de acid 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoic: se dizolvă 10 mg acid 5,5'-ditiobis-2-nitobenzoic în 100 ml tampon fosfat pH = 7,4.

-În sînge: în două eprubete M şi P se introduc:

Eprubeta/ reactivi	M	P
Solu□ie de acid ditio-bis-nitrobenzoic(ml)	3	3
Iodură de acetilonă 5% (ml)	0.1	0.1
Ser normal (microlitri)	20	-
Ser de cercetat (microlitri)	-	20

Se lasă în repaus 2 minute. Absența diferenței de culoare întrecele două eprubete indică prezența compuşilor organofosforici sau a altor inhibitori ai colinesterazei.

B. Dozare:

Metoda spectrofotometrică

Principiu:

Colinesteraza serică (pseudocolinesteraza, BuCnE,EC 3.1.1.B) eliberează prin hidroliza butirilcolinei, tiocolina, care reacționează cu DTNB (acid 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoic) dând un compus colorat galben maximum de absorbție la 412 nm (ε_{mM}= 13,6).

Reacții:

1. Subsrat: Se dizolvă unul din cele 5 comprimate aflate în cutia nr.1 în 5 ml apă bidistilată, prin agitare uşoară a substanței. Soluția este stabilă minimum două săptămâni la 4°.
2. Reactiv de culoare: Se dizolvă comprimatul aflat în cutia nr.2 într-un volum aproximativ de 50 ml apă bidistilată. Pentru grăbirea dizolvării se pote sfărâma comprimatul cu o baghetă de sticlă. Se trece soluşia într-un cilindru gradat de 250 ml şi se completează volumul la 130 ml apă bidistilată. Se adaugă 120 ml etanol de 95°. Soluția este stabilă la temperatura camerei timp de mai multe luni.
3. Serul de analizat: Se diluează 1/11, pipetând într-un tub de hemoliză 0,2 ml NaCl 0,9% şi 0,02 ml aer (se foloseşte micropipeta destinată dozării hemoglobinei). Serul de analizat poate fi păstrat nediluat minimum o săptămână la 4°.

Tehnica de lucru:

Pentru fiecare determinare se pregătesc 2 tuburi de hemoliză în care se pipetează:

	M	P
Substrat(ml)	0.20	0.20
Ser diluat 1/11(ml)	-	0.02
Incubare 10 minute la 25°, apoi se pipetează		
Reactiv de culoare(ml)	2.0	2.0
Ser diluat 1/11(ml)	0.02	-

Se citeşte extincția probei la 412 nm față de martor, la un interval de maximum 15 minute de la adăugarea ultimului reactiv.

Calculul activității:

1. Unitatea (U) de activitate enzimatică este corespunzătoare cantității de enzimă carte hidrolizează 1µmol butirilcolină în timp de 1 minut la temperatura de 25°. Activitatea serică se exprimă în U/L.

U/L colinesterează = 8978 x E_{412}. Valorile normale pentru condițiile descrise mai sus sunt cuprinse între 3000 – 8000 U/L ser.

Valoare diagnosticată:

BuChE scade în insuficiențele hepatice, intoxicații cu organofosforice şi în denutriție proteică gravă. Creşteri se întâlnesc în sindromul nevrotic, diabet, hiperlipemie.

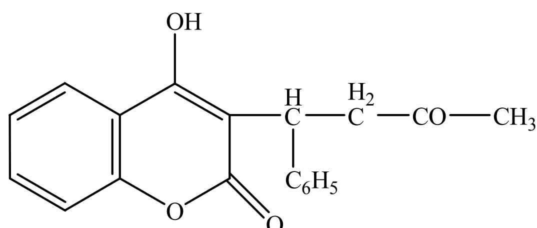
Observații:

a. Fotometrele de tip Pulfrich FEK sau alte instrumente cu filtrare colorate nu pot fi folosite. Sunt adecvate spectrofotometre de ori ce tip, spectrofotometrul Spekol sau instrument lampă de descărcare în gaz (Hg) prevăzute cu filtre de interferență pentru 405 nm.

b. Pentru determinări la un număr mare de subiecți (anchete epidemiologice) se recoltează 0,02 ml sânge din pulpa degetului şi se introduc imediat în 1 ml apă distilată. Se spală pipeta de mai multe ori prin aspirare şi refulare. Pentru determinări se folosesc 0,02 ml sânge diluat 1/51, timpul de incubare fiind prelungit la 40 minute. Se recomandă ca determinările să fie efectuate în aceiaşi zi. U/L colinestereză = 10 . 410 x Δ_{412}. Valorile normale pentru sânge integrat sunt cuprinse între 1600 ți 4400 U/L.

c. Cutia cu comprimate se păstrează la loc răcoros, ferit de umiditate. După deschiderea cutiei se recomandă învelirea comprimatelor rămase în etanol şi păstrarea la 4°C.

DETERMINAREA WARFARINEI



A. Izolare:

Warfarina (etilhidroxicumarina) se izolează prin extracție cu solvenți organici din mediu acid.

Izolare din produse biologice: 5 g țesut, 5ml sânge sau 10 ml urină se tratează cu puțin nisip purificat, cu o cantitate dublă de sulfat de sodiu anhidru şi 0,5 g acid tartric, până se obține o masă solidă. Amestecul se aduce cantitativ într-un Erlenmeyer şi se extrage cu 20 ml acetonă sau dicloretan prin agitare timp de 20 minute. Se filtrează într-o capsulă, spălând filtratul cu acetonă, iar fazele organice se evaporă la sec pe B.M Reziduul se foloseşte pentru reacții identificare.

B. identificare:

1. Reziduul se dizolvă în 1-2 ml tampon fosfat pH = 8, apoi se adaugă 0,5 ml soluție 4-aminoantipiridină 1% şi 0,5 ml soluție fericianură de potasiu 3% când rezultă o colorație roşie.

2. Reziduul se dizolvă în 1 ml hidroxid de sodiu 10%, se încălzeşte pe B.M. timp de 1-2 minute. După răcire, se tratează cu 2-3 picături doluție Lugol până laculoarea galbenă, apoi excesul de iod se distruge cu hidroxid de sodiu 10%. În prezența warfarinei se formează iodoform cu miros caracteristic.

3. Reziduulse tratează cu 1- 2 ml amestec sulfonitric şi se ține pe baie de apă la fierbere, timp de 15 minute. După răcire se alcalinizează cu hidroxid de sodiu 20%, când apare o colorație galbenă datorită formării nitroderivatului Warfarinei (reacția Meltzer).

4. Reziduul reluat cu 1 – 2 ml reactiv Liebermann (10 g nitrat de potasiu în 100ml acid sulfuric concentrat) dă o colorație portocalie.

5. Cromatografie în strat subțire

Reziduul dizolvat în 0,2 – 0,5 ml cloroform sau etanol se spotează pe o placă cromatografică, în paralel cu un martor.

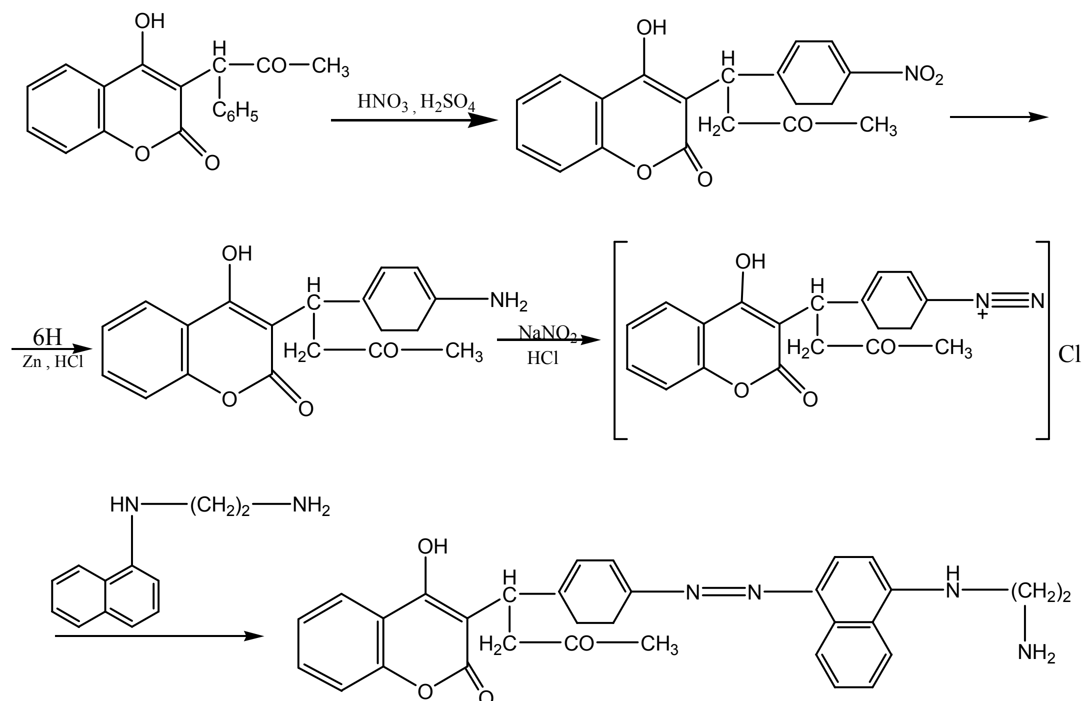
Sistem de migrare = eter de petrol anhidru: anhidridă acetică: cloroform: etanol (10:5:7:1).

Revelarea se face cu un amestec de soluție de ferocianură de potasiu (2 volume) şi clorură ferică 1% (1 volum). Ambele soluții se prepară în etanol 50%, iar amestecul se face extemporaneu.

C. Dozare

Metoda spectrofotometrică

Principiu: Warfarina se nitrază la nucleul benzenic, apoi se reduce, se diazotează şi se cuplează cu NKD obținându-se un azoderivat de culoare violet ce se spectrofotometrează la 550nm, faşă de un martor.



Reactivi:

1. Amestec sulfonitric (acid sulfuric concentrat: acid azotic fumans 1 :).
2. Eter etilic;
3. acid clorhidric 10%;
4. Zinc pulbere;
5. Nitrat de sodiu 0,1%;
6. Uree 10%;
7. N-naftiletilendiamină (NKD) 1%;
8. Soluție standard de lucru se cântăreşte 0,1000 g warfarină şi se aduce la 200 ml cu diclor etan sau acetonă (1 ml = 500µg warfarină) 1%).

Modul de lucru: se tratează reziduul cu 5 ml amestec sulfonitric şi se ține pe B.M. la 60 - 80°c timp de 15 minute, după care se diluează cu 20 ml apă. Se tranzvazează cantitativ într-o pâlnie de separare şi se extrage de două ori cu 20 ml eter etilic. Extractele eterice reunite se filtrează printr-un filtru uscat şi se evaporă la sec pe B,M. Reziduul se dizolvă în 10 ml acid clorhidric 10%, se adaugă 0,2 g zinc pulbere şi se încălzeşte pe B.M. la fierbere. Se lasă în repaus15 minute, apoi se filtrează într-un balon cotat de 25 ml aducându-se cu apă distilată la semn. SE iau 5 ml soluție şi se adaugă 0,2 ml nitrat de sodiu 0,1%, după 10 minute se adaugă 2 ml uree 10%. Se agită şi după 10 minute se adaugă 1 ml NKD 1%. Se obține o colorație roz-roşie care se spectrofotometrează după 10 minute la 550 nm în cuva de 1 cm, față de un martor.

În paralel se lucrează o curbă de etalonare cu concentrații prinse între 25 şi 250 µg warfarină. Valoarea extincției probei se raportează la curba etalon şi se înmulțeşte cu 5 (deoarece s-a lucrat cu 1/5 din probă) obținându-se concentrația C în µg de warfarină peo probă.

Calculul:

Rezultatele se exprimă în mg warfarină pe 100 g produs biologic.

Cap. IX Alcaloizi şi substanţe cancerigene

1. Alcaloizii şi nicotina

Se numesc alcaloizi compuşii organici care conţin azot, extraşi de obicei din plante (se cunosc alcaloizi de natură animală cum ar fi adrenalina) şi care sunt într-o măsură mai mare sau mai mică substanţe cu caracter bazic, ce formează săruri cu acizii.

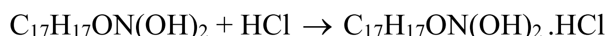
Din punct de vedere analitic trebuie să lărgim oarecum această definiţie, în sensul că compuşii sintetici, care sunt bazele organice care conţin azot, dau un număr de reacţii după care trebuie studiaţi şi ei; de aceea, alături de alcaloizii tipici, vom putea studia după aceste reacţii şi unele substanţe asemănătoare alcaloizilor (antipirina, piramidolul, chinozolul, acrihina etc.). Majoritatea alcaloizilor conţin şi oxigen, afară de carbon, hidrogen şi azot. Numai puţini alcaloizi, mai ales cei volatili şi lichizi, nu conţin oxigen. Aproape toţi alcaloizii aparţin compuşilor heterociclici.

Unii alcaloizi au fost obţinuţi pe cale sintetică.

Majoritatea alcaloizilor (baze libere) sunt nişte substanţe cristaline şi au o temperatură de topire determinată; câţiva sunt la temperatură obişnuită, lichide uleioase, care pot fi antrenate cu vapori de apă şi în general se pot distila. Cei mai mulţi, sub formă de baze libere, se dizolvă foarte greu în apă sau sunt complet insolubili în solvenţi organici: alcool, eter, cloroform, alcool amilic, acetat de etil, benzol etc., unii alcaloizi sunt uşor solubili, alţii greu solubili.

Aproape toţi alcaloizii au un gust amar; majoritatea nu au miros; numai puţini, ca de exemplu coniina şi nicotina, se deosebesc, printr-un miros puternic. Numeroşi alcaloizi sunt optic activi.

Alcaloizii fiind baze au în stare liberă o reacţie mai mult sau mai puţin alcalină. Aceştia formează săruri cu acizii, după tipul sărurilor de amoniu sau al aminelor (fără eliminarea apei):



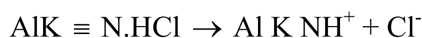
$$C_{17}H_{17}ON(OH)_2 + HCl \rightarrow C_{17}H_{17}ON(OH)_2 .HCl$$

O moleculă de alcaloid cu un atom de azot în moleculă leagă o moleculă de acid monobazic; de exemplu clorhidratul de morfină.

Alcaloizii cu doi atomi de azot în moleculă pot lega, în multe cazuri, una sau două molecule de acid monobazic ca de exemplu $C_{20}H_{24}O_2N_2.HCl$ – clohidratul de chinină, $C_{20}H_{24}O_2N_2.2HCl$ – biclorhidratul de chinină ($K_1=10^{-6}$; $K_2=1,3\ 10^{-10}$).

În aceste cazuri, când a doua constantă de disociere este extrem de mică, asemenea alcaloizi leagă numai o moleculă de acid monobazic, de exemplu stricnina cu acidul clorhidric formează numai sarea cu compoziţia $C_{21}H_{22}O_2N_2 .HCl$ ($K_1=10^{-6}$; $K_2=2\ 10^{-12}$).

Disocierea sărurilor alcaline, ca şi sărurilor de anine, se reprezintă astfel:



$$AlK \equiv N.HCl \rightarrow Al\ K\ NH^{+} + Cl^{-}$$

Majoritatea alcaloizilor sunt baze aminice terțiare; o parte mai mică sunt aminobaze secundare; unii alcaloizi sunt baze de amoniu cuaternare. La formarea sărurilor, acestea din urmă se comportă diferit de celelalte, de exemplu berberina.

Întrucât alcaloizii sunt baze slabe, sărurile lor se descompun nu numai cu baze tari [NaOH, KOH, $Ca(OH)_2$], ci şi cu amoniac şi în majoritatea cazurilor, chiar cu carbonați alcalini; pe această cale se separă bazele libere.

De asemenea, unii alcaloizi au proprietăți chimice care se datorează prezenței în moleculă, pe lângă azotul bazic, a altor grupe funcționale: OH – morfina, salsolina; CO – lobelina; CH_2=CH – chinină; CH_3NHCO – ezerină etc.

Prezența, de exemplu a grupei OH în molecula morfinei îi dă un caracter fenolic, ceea ce condiționează solubilitatea bazei date în alcali, cu formarea morfinatului; acelaşi caracter îl dă grupa OH moleculei salsolinei; gruparea carboxilică, în narceină, condiționează de asemenea solubilitatea în alcali. Prin adăugarea alcalilor, la început se separă morfina liberă şi prin adăugarea ulterioară la sărurile morfinei se formează morfinatul solubil în apă. Morfinatul, ca şi fenoliții, se descompune cu sărurile de amoniu, cu eliberarea morfinei libere. Unii alcaloizi ca de exemplu: atropina, cocaina etc. sunt esteri după structura lor şi se saponifică sub acțiunea mai mult sau mai puțin prelungită a acizilor.

2. Extragerea alcaloizilor

Pentru extragerea alcalozilor din părțile cadaverice, din obiecte bogate în substanțe vegetale extractibile şi alte materiale se foloseşte de obicei metoda Stas – Otto, care se bazează pe următorul principiu: tartrații acizi ai alcaloizilor sunt solubili, atât în alcool de 80 – 90 ^{o}, cât şi în apă; de aceea, alcaloizii se extrag din diferite obiecte de cercetat cu ajutorul alcoolului, care conține acid tartric.

De obicei, prin aceste extrageri pot trece în alcool, alături de alcaloizi, şi diferite impurități şi anume: ele se concentrează până la consistența unui sirop, după aceea reziduul se tratează cu apă şi lichidul se filtrează. Astfel se elimină grăsimile. Dacă se evaporă imediat lichidul apos până la densitatea unui sirop şi se tratează acest sirop cu o cantitate dublă sau triplă de alcool pur (mai bine absolut), atunci precipită, în general, substanțele proteice. Prin repetarea operației menționate, se elimină de obicei impurități care pot împiedica identificarea alcaloizilor. Lichidul acid obținut se supune extracției, cu ajutorul solvenților corespunzători.

Substanța de cercetat se mojarează, se introduce într-un balon şi, în cazul unei reacții alcaline, se adaugă acid tartric până la o reacție acidă netă. Dacă substanța de cercetat are reacție acidă, atunci se neutralizează cu carbonat de sodiu şi apoi se acidulează din nou cu acid tartric, până la reacția net acidă. Apoi se acoperă masa cu o cantitate dublă sau triplă de alcool 90^{o}. Se montează balonului un tub lung de sticlă, care are rolul unui refrigerent ascendent, se încălzeşte câteva ore pe o baie de apă la 60 – 70^{o} şi apoi lichidul se lasă să se răcească.

Dacă reacția lichidului nu va fi net acidă, se adaugă acid tartric şi se încălzeşte din nou. Lichidul se decantează, iar reziduul din balon se acoperă din nou cu un volum dublu de alcool, care conține acid tartric, şi se extrage a doua sau a treia oară.

Extractele reunite se filtrează, filtratul se evaporă într-o capsulă de porțelan, pe o baie de apă, la cel mult 60°, până la consistența siropoasă. După răcire, reziduul se tratează cu apă caldă şi, după limpezirea lichidului se filtrează printr-un filtru umezit cu apă. Filtru apos se evaporează din nou până la consistența siropoasă; reziduul se tratează cu un volum de 3 – 4 ori mai mare de alcool, care se adaugă treptat, în cantități mici. După limpezire lichidul se filtrează şi filtratul se evaporează din nou.

Printr-o tratare alternativă cu apă şi cu alcool, purificarea extractelor, se repetă până la dizolvarea reziduului, soluțiile rămânând transparente (atât cea în apă cât şi cea în alcool). În final, reziduul se evaporă pe o baie de apă, până la eliminarea urmelor de alcool, se dizolvă în 30-50 cc apă, se filtrează printr-un filtru umezit cu apă; în această stare, lichidul este pregătit pentru extracțiile următoare.

3. **Extracția cu solvenți organici**

Lichidul acid se extrage cu un volum egal de eter pur, într-o pâlnie de separare, şi se separă stratul de eter. Extracția se repetă de două ori, cu porții noi de eter, şi se adaugă la primul extract.

În soluția eterică trec grăsimile şi acizii graşi, rezinele, substanțele colorante; trec de asemenea, în cantități infime, unii alcaloizi cu un slab caracter bazic: colchicina, cafeina, apoi atropina şi veratrina.

Când extractul eteric este colorat în roşu sau violet, atunci în lichidul acid apos poate fi prezentă apomorfina, ale cărei produse de disociere se dizolvă în eter dând o colorație roşiatică sau violetă.

Din soluția acidă pot trece în cloroform cantități considerabile de stricnină, ca şi o parte mare de cafeină. Aceasta se explică prin faptul că colchicina (K_b=4,5 10^{-13}), cafeină (K_b=4,1 10^{-12}) şi alte câteva baze foarte slabe formează cu acizii săruri ce sunt hidrolizate în întregime în soluție apoasă şi se descompun în acid şi bazele libere ale alcaloizilor, care baze trec apoi în solvenții organici. Extractul eteric se filtrează, se toarnă în sticle de ceas, eterul se evaporează şi cu reziduurile se fac cercetări corespunzătoare. Lichidul apos acid se suprasaturează apoi cu hidroxid de sodiu şi se extrage din nou de câteva ori cu eter sau $CHCl_3$. Extractul eteric se culege întru-un balon şi după limpezire, se filtrează. Extractul eteric din soluție alcalină poate să conțină aconitină, coniină, atropină, brucină, chelidonină, chinină, cocaină, codeină, emetină, hiosciamină, narcotină, nicotină, papaverină, fizostigmină, solanidină, stricnină, tebaină, veratrină, plus resturi de colchicină şi cafeină.

Extractul eteric din soluția alcalină se toarnă în sticle de ceas, ca şi mai sus, eterul se evaporează şi cu reziduul se fac reacțiile respective. Lichidul alcalin rămas se suprasaturează cu acid clorhidric diluat, apoi se adaugă amoniac până la o reacție alcalină şi se extrage de câteva ori cu eter. În acest extract poate fi apomorfina.

După aceasta, lichidul apos amoniacal se extrage de câteva ori cu alcool amilic sau cu cloroform, dar mai bine cu un amestec de 5 – 10% alcool cu cloroform. Extractul cloroformic poate să conțină morfină, narceină, pilocarpină (pentru extragerea acesteia este mai bine ca lichidul acid să se alcalinizeze cu bicarbonat de sodiu).

După evaporarea solventului, se fac reacții de identificare cu reziduul.

După ultima extracție, lichidul apos, se evaporă la sec în prezența nisipului curat şi reziduul pulverizat se extrage cu alcool absolut la uşoară încălzire. Alcoolul se evaporă, reziduul se reia cu apă caldă, se filtrează, se evaporă la sec, apoi se tratează cu alcool absolut, iar soluția se lasă să se evapore la temperatura camerei. La extragerea alcaloizilior din preparatele farmaceutice şi formele medicamentoase nu este necesar să se folosească întreg procedeul de separare al alcaloizilor expus mai sus.

În general, este suficientă folosirea schemei simplificate de extragere.

4. Baze libere ale alcaloizilor

Caracterul alcaloid al unei substanțe se manifestă în proprietățile sale bazice, prin formarea de săruri cu acizii ce pot fi descompune cu baze mai puternice. Unii alcaloizi dau o reacție net alcalină față de hârtia de turnesol. În majoritatea cazurilor dacă există alcaloid liber, hârtia de turnesol se albăstreşte. Se pune apoi o cantitate infimă de substanță pe o sticlă de ceas, se adaugă 1 – 2 picături de apă şi o picătură de acid clorhidric. Alcaloid sub formă de bază liberă se solubilizează prin adăugarea acidului clorhidric. Dacă adăugăm la o soluție acidă, picătură cu picătură, o soluție de carbonat de sodiu, majoritatea alcanoizilor se separă sub formă liberă, deseori în stare cristalină. Prin dizolvarea substanței în apă acidulată şi precipitarea ei cu carbonat de sodiu se poate determina caracterul bazic al alcaloidului.

Grupa mare de reactivi care precipită alcaloizii o formează în principiu acizii, şi ea poate fi împărțită în două grupe:

1. *Acizi simpli*
   a) acid picric
   b) tanin
   c) acid picrolonic, etc.
2. *Acizi complecşi*, care pot fi împărțiți la rândul lor în două subgrupe – într-una din ele rolul principal îl are cationul, iar în cealaltă anionul:

a) HgI_2 KI
BiI_3 KI
$HgCl_2$
$HAuCl_4$
H_2PtCl_6
CdI_2 KI, etc.

b) I_2 KI
H_3PO_4 $12MoO_3$
H_3PO_4 $12WO_3$ $2H_2O$
$12WO_2$ SiO_2 $4H_2O$, etc.

O moleculă de bază monoacidă reacționează cu un echivalent de acid. Aceste reacții, ca şi precipitarea alcaloizilor cu acidul silicowolfracmic, sunt folosite la determinarea cantitativă a unor alcaloizi.

Pentru determinare, probei calitative de precipitare a se dizolvă o cantitate mică de substanță alcaloidică în 1 – 2 cc apă acidulată cu câteva picături de acid clorhidric diluat, se

toarnă în picături pe câteva sticle de ceas şi fiecare sticlă se tratează cu câte o picătură din diferiții reactivi de precipitare.

Dacă se obțin precipitate cu majoritatea reactivilor, putem conchide asupra prezenței alcaloizilor (dacă este exclusă prezența altor substanțe care dau precipitate cu reactivi generali pentru alcaloizi, de exemplu albuminele, etc.).

Din soluții nu prea diluate de alcaloizi se pot obține cu ajutorul acizilor, $HAuCl_4$ (acid auroclorhidric) şi H_2PtCl_6 (acid platino – clorhidric), complecşi bine cristalizați. De asemenea, sublimatul corosiv formează precipitatele cristaline cu numeroase săruri ale alcaloizilor.

Prezența azotului în alcaloizi se face prin reacția cu sodiul metalic.

Câțiva dintre numeroşii reactivi de precipitare ai alcaloizilor sunt:

IOD – IODURĂ DE POTASIU

(reactiv Wagner, Boucharda)

Soluția, compusă din 5 g iod şi 10 g iodură de potasiu în cc de apă, formează cu soluțiile apoase ale sărurilor alcaloizilor, precipitate care variază de la brun - deschis până la brun - închis; acestea reprezintă produsele de combinare ale hidroiodurilor alcaloizilor cu iodul liber: Alk. (HI).

IODURA DE BISMUT CU IODURA DE POTASIU

(reactivul Dragendorf)

Acest este o soluție de iodură de bismut într-o soluție de iodură de potasiu. Se dizolvă 80 părți de nitrat bazic de bismut în 200 părți de acid azotic (greutatea specifică 1,18) şi, în soluția astfel obținută, se toarnă o altă soluție, formată din 272 părți iodură de potasiu în 300 părți apă. După câteva zile, soluția se filtrează, pentru a elimina salpetrul care s-a format. Cu sărurile alcaloizilor, într-un mediu de acid clorhidric sau acid sulfuric, soluția formează un precipitat amorf de culoare roşu – portocalie (teobromina formează un precipitat cristalizat).

ACIDUL FOSFOMOLIBDENIC

H_3PO_4 $12MoO_3$ (reactivul Sonnenschein)

Soluția de fosfat de sodiu, acidulat cu acid azotic, se tratează cu o soluție de molibdat de amoniu acidulată cu acid azotic, la o temperatură de 40 ^{o}, până la încetarea formării unui precipitat galben. Acesta se filtrează, se spală bine, se agită, se suspendă în apă şi se încălzeşte cu o soluție concentrată de carbonat de sodiu, până la completa dizolvare. Soluția obişnuită a amoniacului, se umectează cu acid azotic şi, în cazul reducerii preparatului (colorație de la albastru, până la negru), se calcinează din nou. Acest reziduu se dizolvă într-o cantitate de 10 ori mai mare de apă şi se adaugă o cantitatea de acid azotic necesară pentru ca precipitatul format la început să se dizolve din nou.

Reactivul formează precipitate chiar în soluții foarte diluate (neutre sau acide) ale sărurilor de alcaloizi şi este unul din cei mai sensibili reactivi, comuni tuturor alcaloizilor. Precipitatele sunt colorate în galben deschis sau brun – galben şi adesea se colorează în albastru sau verde, din cauza reducerii acidului molibdenic. Unele precipitate se dizolvă în amoniac, uneori dau o colorație albastră caracteristică, de exemplu, în prezența berberinei, coniinei; colorație verde – în prezența brucinei şi codeinei.

IODO – MERCURIATUL DE POTASIU

(reactivul Mayer)

Soluția formată din 1 parte sublimat coroziv în 50 părți apă se amestecă cu o soluție făcută din 4 părți de potasiu în 50 părți apă. Acest reactiv formează cu majoritatea alcaloizilor, într-un mediu neutru sau slab acid, precipitate de culoare albă sau albă-gălbuie; nu precipită colchicina, cafeina, solanina.

SOLUȚIA DE TANIN

Soluția proaspăt preparată din 1 parte tanin în 9 părți apă formează cu majoritatea alcaloizilor, atât într-un mediu neutru cât şi în unul slab acid, precipitate de culoare gălbuie, solubile în alcool, acid acetic, şi săruri de amoniu.

ACIDUL FOSFOWOLFRAMIC

(reactivul Scheibler)

Se dizolvă 10 părți wolframat de sodiu şi 7 părți fosfat de sodiu în 50 cc apă şi se acidulează cu acid azotic. Reactivul precipită aproape toți alcaloizii. Precipitatele se descompun cu hidroxid de bariu sau hidroxid de calciu, cu eliberarea alcaloizilor liberi.

ACIDUL PICRIC

Soluția apoasă 1% precipită majoritatea sărurilor alcaloizilor sub formă de picrați de culoare galbenă, în stare amorfă sau cristalizată. Din soluțiile sulfurice diluate se precipită majoritatea alcaloizilor (complet sau parțial). Numai din soluțiile mai concentrate se precipită parțial: aconitina, atropina, cocaina, hiosciamina. Mult mai sensibilă este o soluție alcoolică saturată la care s-a adăugat glicerină 5%.

În practică se folosesc primii trei reactivi. Reacția negativă dovedeşte, cu rare excepții, absența alcaloizilor şi garantează exactitatea concluziilor. Reacția pozitivă, cu oricare din reactivii generali citați, necesită continuarea cercetărilor cu reactivi specifici pentru diferiți alcaloizi.

REACȚII SPECIFICE ALE ALCALOIZILOR

Reacțiile este următoarea: la reziduul unui alcaloid se adaugă o baghetă de sticlă, pe o sticlă de ceas, 1-2 picături de reactiv şi se urmăreşte apariția colorației (uneori prin încălzire la o baie de apă) şi modificările ulterioare posibile care reprezintă câteodată momentul decisiv.

METODE PENTRU CERCETAREA ALCALOIZILOR DIN AMESTECURILE MEDICAMENTOASE

O cantitate mică de pulbere sau câțiva ml de soluție se diluează cu 5 ml apă; soluția se introduce într-o pâlnie de separare, se alcalinizează cu amoniac şi se extrage cu 5-10 ml cloroform (sau eter). Extractul cloroformic se filtrează, o parte se evaporează şi reziduul, după dizolvare în acid clorhidric diluat, se cercetează cu reactivii generali pentru alcaloizi. Cealaltă parte din extractul cloroformic se evaporă (pe o baie de apă) şi cu reziduul se fac reacțiile respective sau altă probă.

Adesea avem posibilitatea, în funcție de compoziția formei medicamentoase, să simplificăm acest procedeu, de exemplu, să extragem alcaloidul direct, în cazul când el există sub formă de bază liberă şi să executăm ulterior reacțiile necesare.

DETERMINAREA CANTITATIVĂ

Metoda se bazează pe separarea cu alcalii (NaOH, KOH, NH_4OH, Na_2CO_3) a bazei libere din sărurile alcaloizilor şi extragerea ei cu solvenții organici potriviți.

Se pun 1 – 2 g pulbere sau o cantitate corespunzătoare de soluție într-o pâlnie de separare, se adaugă 10 – 15 ml de apă, se alcalinizează cu hidroxid de sodiu şi se extrag de mai multe ori (3 – 4 ori) cu cloroform sau alt solvent. Extractele cloroformice sau eterice reunite se spală cu o cantitate mică de apă (5 ml), se separă stratul de cloroform şi se filtrează. Cloroformul se distilă, reziduul se usucă şi se cântăreşte; de cele mai multe ori se determină pe cale volumetrică. Pentru aceasta, reziduul se dizolvă în 10 ml alcool (printr-o uşoară încălzire pe o baie de apă), soluția se tratează cu 15 ml de apă, 2 picături de soluție de roşu de metil şi se tratează cu o soluție de acid clorhidric 0,01 n.

La titrarea majorităților alcaloizilor, se întrebuințează cu succes roşu de metil.

În majoritatea cazurilor, bazele biacide ca şi cele monoacide, se titrează net în prezența roşului de metil [brucina, chinina, nicotina, novocaina (bază), stricnina].

Pe lângă titrarea directă, se întrebuințează cu succes metoda titrării inverse; pentru aceasta baza se dizolvă într-un exces cunoscut de HCl 0,01 n, în prezența indicatorului roşu de metil.

5. Metode de precipitare

- formare poliiodurilor poate servi la determinarea cantitativă a numeroşilor alcaloizi. Alcaloidul se precipită cu excesul de iod în iodură de potasiu; în filtrat se titrează excesul de iod cu tiosulfatul de sodiu

- precipitat cu iodo-mercurat de potasiu. Metoda se bazează pe formarea precipitatelor de alcaloizi într-un mediu de acid clorhidric, cu reactivul Mayer. Precipitatele cu compoziția generală Alk. HI (HgI_2) n: excesul iodo-mercuratului de potasiu se determină, fie prin titrare cu NaCl, fie prin metoda Babici.
- precipitare sub formă de silicowolframați după metoda lui Cliacichina.
- metoda combinată. Bazele alcaloizilor se dizolvă în exces de acid clorhidric 0,1 n sau 0,01 n şi soluția se tratează cu un exces de iod – iodură de potasiu. Într-o parte a filtratului, după decolorarea iodului cu tiosulfatul de sodiu, se titrează excesul de acid cu un hidroxid alcalin (indicator – fenolftaleică).

Pentru unii alcaloizi se foloseşte aceeaşi metodă, cu reactivul lui Mayer.

Microdeterminarea alcaloizilor din formele medicamentoase complexe cu reactivul Dragendorf – Bolotnicov şi Craizman.

Aminometria alcalizilor

Prin aminometrie se înțelege determinarea volumetrică a aminelor, bazată pe reacția aminelor cu acizii.

Reacția nu poate avea loc într-un mediu apos sau alcoolic şi, în general, în condițiile care favorizează transformarea aminelor în baze (formarea ionilor OH). În general, autorii consideră că acidul potrivit pentru aminometrie acidul paratoluensulfonic dizolvat în cloroform. Titrul soluției se stabileşte în prezența hexametilentetraminei. Ca solvenți se folosesc: tetraclorura de carbon, cloroformul (cel mai des), tetracloretanul, clorura de metil. Pentru prepararea soluției 0,2 n de acid paratoluensulfonic se dizolvă circa 8,6 g preparat anhidru (greutate moleculară 172,12) în cloroform şi se completează cu cloroform până la un litru. Pentru stabilirea titrului, se ia o cantitate cântărită de 0,05 g hexametilentetramină (a), se dizolvă în 10 cc cloroform şi, după adăugarea a 5 picături dintr-o soluție cloroformică de dimetilaminoazobenzol 0,05% se titrează cu acidul al cărui titru se determină până la virarea culorii galbene în roşie. Dacă titrarea va necesita b cc, atunci factorul pentru acidul paratoluensulfonic 0,2 n va fi:

$$F=142,7\ a/b.$$

Pentru accelerarea virării culorii, se adaugă aproximativ 1% fenol.

Cantitățile cântărite de amine şi alcaloizi se titrează după aceeaşi metodă. Nu se pot determina aminele primare volatile (RNH_2) sau greu solubile în solvenții indicați. Se titrează bine aminele secundare R_2NH şi terțiare R_3N. Metoda are o importanță practică pentru determinarea unor preparate farmacopeice cu caracter bazic: urotropina, dietilamina, benzoamina, anilina, α şi β – naftalina, paraanizidina, pantocaina, percaina, piridina, chinolina, acridina etc.

Majoritatea alcaloizilor se titrează bine aminometric. Se determină aminometric alcaloizii din frunzele de Belladonna, iarba de Lobelia şi rădăcina de Harmala.

Nicotina: $C_{10}H_{14}N_2$, este un lichid incolor, cu punct de fierbere 246^o levogir, $[\alpha]_D$ – 163^o; sărurile nicotinei sunt dextrogire. Nicotina se dizolvă în apă, în orice proporții, la temperaturi mai joase de 60^o şi mai înalte de 210^o; între aceste limite este numai parțial miscibilă cu apa. Nicotina este solubilă în dizolvanți organici. La aer se colorează în brun.

Nicotina, pricipalul alcaloid din tutun (diferite specii de Nicotiana din familia solanaceelor, printre care cele mai importante sunt nicotiana tabacum şi nicotiana rustica, ambele cultivate), este însoțită în plantă de 11 alți alcaloizi ce apar în cantități mult mai mici. După structura lor, se împart în trei grupe:

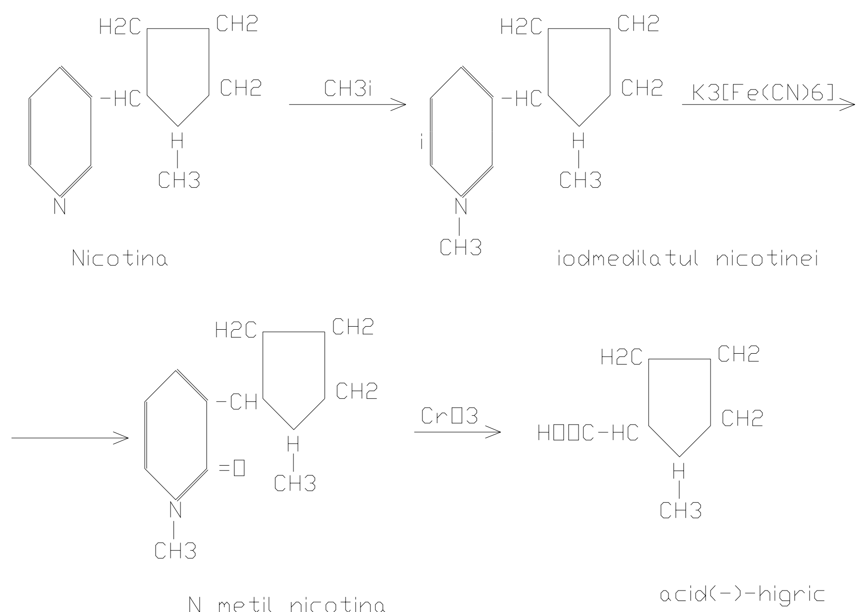
Alcaloizi cu un singur inel	Alcaloizi cu un inel piridinic legat de un inel pirolidinic	Alcaloizi cu un inel piridinic legat de un inel piperidinic sau piridinic
Prolidină N – Metilpirolidină Piperidină	(-) Nicotina Nicotirina (-) Nornicotina (+) Nornicotina	Analeasină N – Metilanabasină Anataleină N – Metilanatabină 2,3` Dipiridil

În afară de tutun, nicotina mai apare în numeroase plante (printre care câteva specii de *Licopodium*) însă în totdeauna în cantități mici. Anabasina, care se găseşte în tutun în proporție foarte mică, este alcaloidul principal din *Anabasis aphylla*, o chenopodiacee. (+) Narcotina se găseşte într-o solanacee australiană (*Duboisia hapwoodii*) şi în cantitate mai mică în tutun (din care se izolează o (±) nornicotină).

Nicotina se mai găseşte în frunzele de tutun sub forma sărurilor cu acizii citric şi malic. *Nicotiana tabacum* conține circa 2% nicotină, iar *Nicotiana rustica* circa 8% nicotină. Nicotina brută se prepară de obicei din praf de tutun, prin tratare cu hidroxid de sodiu, distilare cu aburi şi extragere cu un dizolvant, cum ar fi benzenul, eterul de petrol sau chiar petrolul lampant. Nicotina se purifică prin distilare într-o atmosferă de gaz inert sau prin recristalizarea oxalatului.

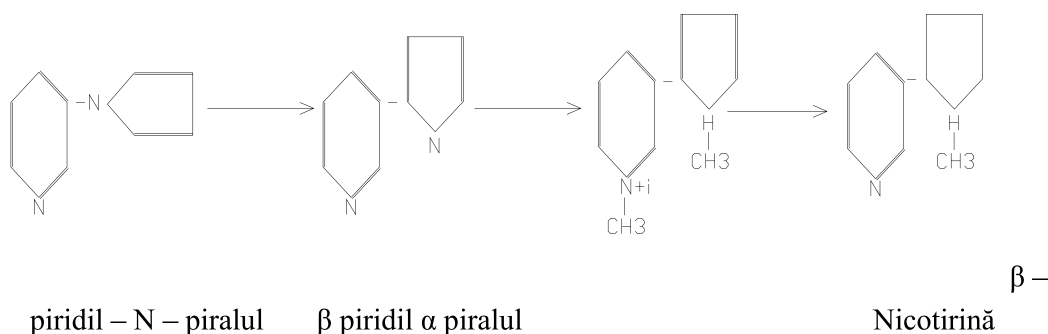
Structura nicotinei a fost stabilită prin reacții de degradare şi prin sinteze. Oxidarea cu diverşi agenți oxidanți duce la acidul β – piridin carboxilic, numit acid nicotinic.

Nicotina este, prin urmare, un derivat al piridinei, având o grupă $C_5H_{10}N$ în poziția β. Grupa aceasta s-a dovedit a fi N – metil – pirolidină. Aşadar nicotina este: α (β' piridil) N metilpirolidina.



Se obține astfel acidul N – metilpiranidinic α carboxilic s-au acidul higric şi anume în forma levogiră, acelaşi care se formează din higrină, din (-) prolină. Configurația sterică a nicotinei este deci aceeaşi ca a amino – acizilor naturali.

O primă sinteză a nicotinei a fost realizată de A. Pictet (1904). Prin distilarea uscată a sării acidului mucic cu β – amino – piridină se formează se formează întâi β- piridil – N – pirolul. Trecut printr-un tub încălzit la roşu, acest compus se izomerizează dând β – piridil – α – pirolul care, alchilat cu iodură de metil, trece în iodmetilatul nicotirinei. Prin distilarea acestuia cu var se obține apoi *nicotirina.*

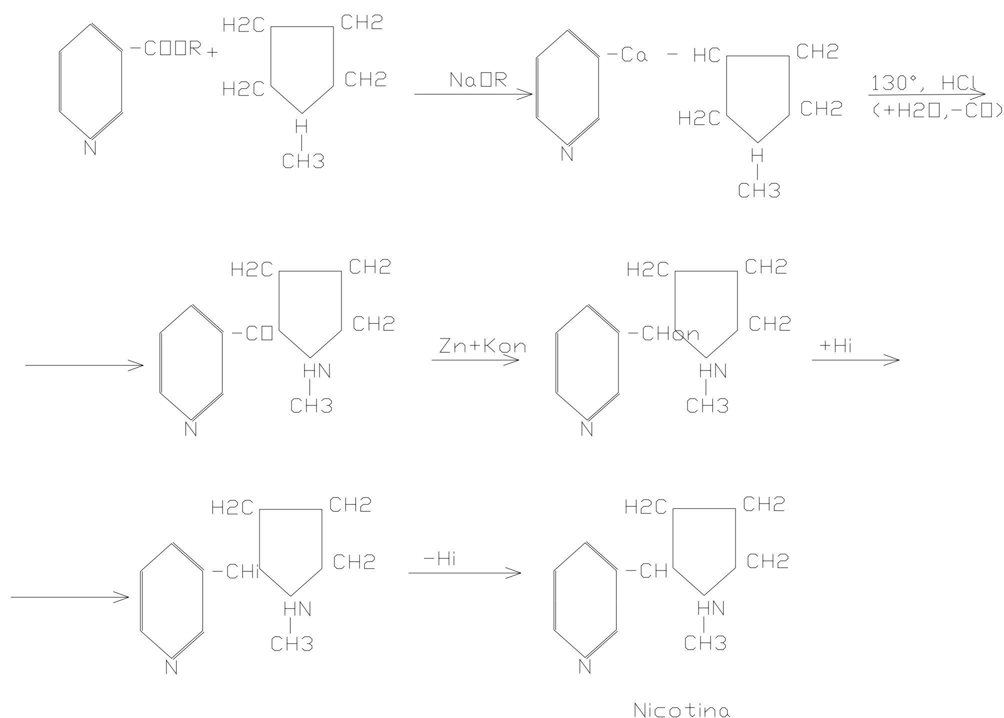


β –

piridil – N – piralul β piridil α piralul Nicotirină

Nicotirina se formează şi din nicotină, prin dehidrogenarea cu agenți oxidanți slabi. Prin hidrogenarea nucleului pirolic al nicotirinei, se formează nicotina. Pictet a realizat această reacție iodurând şi bromurând succesiv nicotirina, în nucleul pirolic şi reducând compuşii obținuți, cu zinc şi acid clorhidric. Mai târziu, hidrogenarea nicotirinei la nicotină, s-a făcut şi pe cale catalitică.

O altă sinteză a nicotinei se bazează pe condensarea esterului acidului nicotinic, cu N – metilpirolodină, în prezența etoxidului de sodiu (SPÄTH 1928):



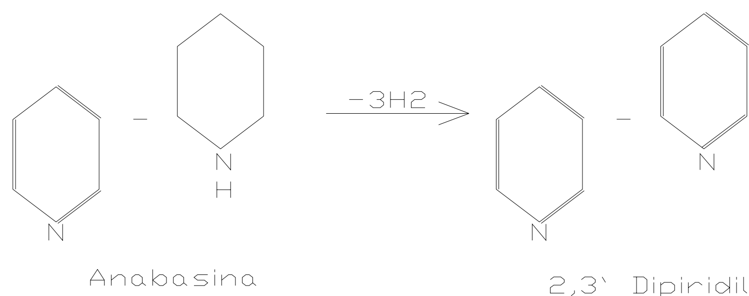
(-) Nicotina este un toxic puternic. Doza letală pentru un om este de aproximativ 40 mg. În cantități mici nicotina acționează ca un excitant al nervilor centrali şi periferici; ce provoacă o secreție mărită a glandelor şi o contracție a vaselor sanguine, deci o creştere a tensiunii arteriale. (+) Nicotina are o acțiune fiziologică de circa 8 ori mai slabă decât (-) nicotina naturală. Nicotina este un toxic puternic pentru insecte şi foloseşte ca insecticid în grădinărie.

Printre alcaloizii care folosesc nicotina în frunzele de tutun (în proporție de 2 – 5 %) au fost identificate următoarele substanțe:

Nicotirina $C_{10}H_{12}N_2$ bisdehironicotina, un lichid incolor, cu punct de fierbere 280 ^oC, se obține ca intermediar în sinteza nicotinei după Pictet.

(-) Nornicotina $C_9H_{12}N_2$ (nicotină fără metil la azot) se găseşte în cantitate foarte mică, împreună cu (+) nornicotina (caracemic) în frunzele de tutun obişnuit. (-) Nornicotina este însă alcaloidul principal din numeroase specii sălbatice de nicotiana.

Anabasina $C_{10}H_{14}N_2$, levogiră, izomeră cu nicotină, se găseşte în tutun numai în cantități foarte mici, este însă alcaloidul principal al unei plante asiatice, *Anabases aphylla* (A. Orecov 1928). Prin oxidarea anabazina dă acid nicotinic, iar prin dehidrogenare catalitică dă 2,3' dipiridil (un compus care de asemenea se găseşte în tutun). De aici s-a dedus că anabasina are următoarea structură, confirmată prin sinteză:



<u>Analabina</u> $C_{10}H_{12}N_2$, care se izolează din capul de distilare al nicotinei brute, are o structură analoagă anabasinei, cu o dublă legătură în inelul piperidinic.

Fumul de țigară conține nicotină şi alți câțiva alcaloizi din tutun, precum şi produşi de descompunere ai acestora, printre care vom menționa numai *miosmina*, $C_9H_{10}N_2$, o nornicotină, conținând o dublă legătură în inelul piranidinic. Din fumul de tutun se depun gudroane, în care s-au identificat hidrocarburile cancerigene. Cancerul pulmonar este mai răspândit printre fumătorii de țigări decât printre nefumători.

6. Producerea alcaloizilor de către plante

Sunt substanțe organice azotate complexe, produse doar de către organismul vegetal, ce prezintă o reacție alcalină mai mult sau mai puțin importantă. Sunt produşi finali ai metabolismului azotat. Se cunosc aproximativ 5000 de alcaloizi naturali diferiți. Alcaloizii se pot localiza în frunze (ceai, coca), semințe (cafea), rădăcini şi scoarță, spermodermă (brânduşe), „scoarța" fructului (mac), canale secretoare, laticifere etc.

În general, alcaloizii se caracterizează prin structuri heterociclice. Datorită azotului din moleculă, prezintă caracter bazic. Sunt substanțe insolubile în apă şi solubile în solvenți organici. Reacționează cu acizii minerali şi formează săruri solubile. În plante se găsesc sub formă de săruri ale acizilor oxalic, citric, malic, fumaric etc. Dau reacții caracteristice de precipitare cu numeroşi reactivi (iodura de potasiu, clorura de platină, acid picric, acid sulfuric etc.).

Exercită efecte fiziologice considerabile asupra omului şi asupra animalelor. Alcaloizii sunt folosiți în terapeutică drept narcotice şi calmante. Unii alcaloizi sunt otrăvuri puternice, spre exemplu curara, ce are capacitatea de a paraliza sistemul nervos. Se consideră că alcaloizii constituie mijloace de apărare ale plantelor împotriva insectelor. Unii alcaloizi, de exemplu nicotină, joacă rol în procesele enzimatice de oxido-reducere.

Plantele producătoare de alcaloizi sunt dicotiledonatele, iar în măsură mai mică monocotiledonatele şi criptogamele. În general o plantă conține mai mulți alcaloizi. Conținutul în alcaloizi depinde de vârsta plantei, regiune, climă şi anotimp. Algele şi muşchii nu au alcaloizi. Ei sunt rari la ciuperci (ergotamina), la pteridofite (nicotină de la *Equisetum*, coniina sporilor de *Lycopodiu*) şi la gimnosperme (efedrina de la *Ephedra)*. La angiosperme, anumite familii sunt recunoscute prin bogăția lor în alcaloizi: *Solanaceae* (solanina, nicotina, hiosciamina, atropină ş.a.), *Rubiaceae* (cofeina, ernetina, chinina), *Papaveraceae* (morfina, papaverina, codeina, narseina ş.a.). Alcaloizii mai importanți sunt:

coniina, nicotina, tropanul, atropina, cocaina, chinina, papaverina, morfina, codeina, stricnina, cofeina etc.

Coniina se extrage din semințele de cucută. Este o otravă puternică, care în doze mari produce moartea prin paralizia centrului nervos respirator. Acest alcaloid prezintă nucleu piperidinic.

NICOTINĂ (β – piridin – N – metilpirolidina) este principalul alcaloid din tutun. În cantități mari este excitant al nervilor centrali şi periferici şi provoacă contracția vaselor sanguine. În cantități mari este un toxic puternic. Este un alcaloid care conține un nucleu piridinic legat de un heterociclu pirolidinic.

TROPANUL, ATROPINĂ ŞI COCAINA se extrag din solanaceae, convolvulaceae, dioscoraceae, şi eritroxilaceae. Din punct de vedere chimic, aceşti alcaloizi sunt esteri ai unor alcooli derivați de la tropan. Atropină acționează asupra sistemului nervos parasimpatic. Ea produce o relaxare a muşchilor netezi şi se foloseşte ca medicament antispasmodic. În cantitate mică dilată pupila, în cantități mari este toxică. Cocaina, în cantități mici este anestezic local, iar în cantități mari produce paralizia nervului central.

MORFINA şi CODEINA se extrag din opiu. Morfina determină o insensibilitate la dureri datorită acțiunii asupra sistemului nervos central. Codeina nu posedă însuşiri narcotice. În cantitate mică se foloseşte ca medicament contra tusei. Codeina are structură chimică similară morfinei cu deosebirea că din nucleul A este înlocuit hidroxidul cu o grupare metoxilică. Morfina şi codeina conțin în moleculă un inel fenantrenic parțial saturat.

CHININA se extrage din arborele de chinină. Se utilizează la combaterea malariei. Reglează temperatura corpului uman. Chinina conține în molecula ei un eterociclu chinonic.

PAPAVERINA se extrage din sucul lăptos al capsulelor necoapte de mac (opiu). Ea acționează direct asupra musculaturii netede. Papaverina conține în moleculă heterociclu izochinolinic.

STRICNINA se extrage din semințele şi frunzele plantei numită *Strychnos mix voimica* (turta lupului). Este o otrava puternică. În cantități mici este toxic general iar în cantități mari este insecticid. Stricnina conține în moleculă heterociclu indol.

COFEINA se extrage din boabele de cafea. Este un excitant al sistemului nervos. Cofeina conține în moleculă ciclul purinic.

Alcaloizii sunt produşi finali de metabolism ai compuşilor azotați şi constituie mijloace de protecție şi de apărare ale plantelor. În cantități mici pot fi folosiți ca substanțe farmaceutice, iar în cantități mari acționează ca insecticide şi otrăvuri.

Nicotina, una din cele mai mult de 4000 chimicale găsite în fumul de la produsele tabacice cum ar fi: țigaretele, trabucurile şi pipele, este un component esențial din tutun care acționează asupra creierului. Produsele tabacice care la folosire nu elimină fum cum ar fi: tabacul de prizat şi cel de mestecat, conțin de asemeni multe toxine precum şi un nivel înalt de nicotină. Nicotina recunoscută ca una dintre cele mai frecvent utilizate droguri ce crează dependență, este un lichid produs natural, incolor (culoare ştearsă, pal) care devine brun când este ars şi capătă mirosul specific de tutun atunci când este expus la aer. Există mai multe specii de plante tabacice; plantele tabacice sunt utilizate ca principală sursă a producției de tutun din prezent. Cum nicotina a fost identificată pentru prima dată la începutul anului 1800,

a fost studiată extesiv şi s-a demonstrat că are un număr de complecşi şi uneori efecte imprevizibile asupra creierului şi a întregului organism.

Fumatul ţigărilor este cea mai predominantă (răspândită) formă a dependenţei de nicotină în Statele Unite şi pe întreg globul. Majoritatea ţigărilor de pe piaţa mondială în prezent conţin 10 mg sau mai multă nicotină. Prin inhalarea fumului, un fumător mediu inhalează 1-2 mg nicotină / ţigară. Au avut loc substanţiale creşteri în vânzarea, consumul şi a produselor tabacice care nu produc fum, şi mai recent, în vânzarea trabucurilor.

Nicotina este absorbită prin piele şi prin căptuşeala mucoaselor gurii şi nasului sau prin inhalarea în plămâni. Nicotina poate atinge concentraţia maximă din l sânge şi creier foarte rapid. Fumatul ţigărilor, de exemplu, conduce la rapida distribuţie a nicotinei în întregul corp ajungând la creier la numai 10 secunde de la inhalare. Trabucurile şi pipele ce produc fum, pe de altă parte, tipic nu se inhalează fumul, deci nicotina e absorbită lent prin membranele mucoaselor din gurile fumătorilor. Nicotina din produsele ce nu produc fum, de asemenea, este absorbită prin membrana mucoaselor.

7. Dependenţa de nicotină

Nicotina produce dependenţă. Mulţi fumători folosesc tutunul cu regularitate deoarece sunt dependenţi de nicotină. Dependenţa este caracterizată prin căutarea coercitivă a drogului şi folosirea acestuia, chiar în faţa unor consecinţe negative asupra sănătăţii. Majoritatea fumătorilor de tutun exprimă o dorinţă de a reduce sau de a opri utilizarea acestui drog şi aproximativ 35 milioane dintre ei fac o serioasă încercare de a renunţa în fiecare an. Din nefericire, mai puţin de 7% dintre cei care încearcă să renunţe, reuşesc prin proprie iniţiativă mai mult de un an de abstinenţă; cei mai mulţi dintre aceştia au o recădere (recidivă) după cel mult câteva zile de la momentul încercării de a renunţa.

Alţi factori trebuie luaţi în considerare, în afară proprietăţilor nicotinei, inclusiv nivelul ei ridicat de utilizare, numărul mic de consecinţe legale şi sociale ale utilizării tutunului şi proiecte de marketing sofisticate şi metodele de publicitate folosite de către companiile de tutun. Aceşti factori, combinaţi cu dependenţa de nicotină, adesea sunt determinaţi pentru prima utilizare (folosire) şi în ultimul rând, pentru dependenţă.

Efectele nicotinei

Nicotina poate acţiona în două moduri: ca stimulent sau ca sedative. Imediat după expunerea la sedative, apare o „lovitură" cauzată în parte de stimularea de către drog a glandelor de adrenalină şi rezultă descărcări de epinefrine (adrenalină). Afluxul adrenalinei stimulează corpul şi cauzează o eliberare bruscă de glucoză, de asemeni, o creştere a tensiunii arteriale, o respiraţie, şi a bătăilor inimii. Nicotina suprimă, de asemeni, producţia de insulină provenită de la pancreas, ceea ce înseamnă că fumătorii sunt întotdeauna uşor hiperglicemici. Pe lângă aceasta nicotina cauzează indirect o eliberare de dopamină în regiuni ale creierului care controlează plăcerea şi motivaţia. Aceste reacţii sunt similare cu semnele altor abuzuri de droguri precum cocaina şi heroina – şi este adevărat că se află la baza senzaţiilor plăcute exprimate de către mulţi fumători. În mod contrariu, nicotina poate, de asemeni, să exercite un efect de sedative, depinzând de nivelul de trezire (deşteptare) a sistemului nervos a fumătorului şi de doza de nicotină luată.

Expunerea cronică la nicotină are ca rezultat dependența. Cercetările sunt doar la început privind documentarea în legătură cu schimburile neurologice care însoțesc dezvoltarea şi menținerea dependenței de nicotină. Consecințele comportamentale ale acestor schimbări sunt bine documentate, totuşi, mai de 90% dintre fumătorii care au încercat să renunțe fără să caute sprijinul tratamentelor, au recidivat în mai puțin de o săptămână.

Expunerea repetată la nicotină are ca efect dezvoltarea toleranței, condiție în care doze mai ridicate (mai mari) de droguri sunt necesare pentru a produce acea stimulare ca la început.

Nicotina este metabolizată foarte rapid, dispărând din corp în câteva ore. Din această cauză, o parte din toleranță se pierde în timpul nopții şi fumătorii deseori mărturisesc că prima țigară din cursul zilei are cel mai mare efect şi / sau este „cea mai bună". Pe măsură ce zilele trec, se dezvoltă o acută toleranță şi țigările următoare (de după prima țigară) au efect din ce în ce mai scăzut.

Încetarea utilizării nicotinei este urmată de către o serie de simptome specifice utilizării drogului, simptome care uneori pot dura până la o lună sau mai mult; include şi simptome care determină foştii fumători să utilizeze tutunul şi astfel să aibă o recidivă. Siptomele retragerii utilizării nicotinei includ iritabilitate, pofte (dorința de a consuma din nou), deficite de atenție şi cognitive, disturbarea somnului şi apetit crescut şi pot începe încă de la doar câteva ore de la consumarea ultimei țigări. Simptomele pot atinge apogeul încă din primele zile şi vor scădea în intensitate în ultimele săptămâni. Pentru unele persoane, oricum, simptomele pot persista câteva luni sau mai mult.

Un comportament important dar foarte puțin înțeles al sindromului retragerii de la nicotină este dorința (pofta), o nevoie disperată de nicotină care a fost descrisă ca fiind obstacolul principal în obținerea unei abstinențe cu succes. Un nivel ridicat al dorinței de tutun poate persista încă 6 luni sau mai mult. În timp ce sindromul retragerii este relatat referitor la efectele farmaceutice ale nicotinei, muți alți factori comportamentali pot afecta cu seriozitate simptomele retragerii de la folosirea nicotinei. Pentru unele persoane, pipăirea, mirosul şi vederea țigărilor, precum şi ritualul obținerii, folosirii, aprinderii şi a fumatului în sine sunt toate asociate cu efectele plăcute ale fumatului şi pot face retragerea şi / sau dorința de a fuma mai greu de depăşit. În timp ce guma cu nicotină şi rupturile pot uşura aspectele farmaceutice ale retragerii, dorința de a consuma persistă uneori.

Efecte medicale ale nicotinei

Consecințele medicale ale expunerii la nicotină rezultă din efectele amândorura: al nicotinei în sine şi felul cum este consumată. Cel mai pernicios efect al dependenței de nicotină este rezultatul utilizării tutunului, care este justificarea pentru 1 / 4 din numărul total de cazuri care cauzează cancer. În primul rând, printre cazurile cauzate de tutun, de cancer de plămân este de departe numărul – minim de cancer provocator de moarte atât în rândul bărbaților cât şi în rândul femeilor.

În afara cancerului de plămân, fumatul provoacă de asemeni boli (afecțiuni) ale plămânilor cum ar fi: bronşitele cronice şi efizem şi a fost găsit ca agravator a simptomelor asmatice la adulți şi copii. Fumatul este, de asemeni, asociat cu cancerul gurii faringelui,

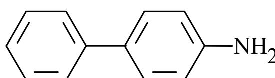
laringelui, esofagului, stomacului, pancreasului, colului uterin, rinichilor, uretrelor şi a vezicii urinare. Ratele obişnuite de deces provocate de cancer sunt de 2 ori mai ridicate în rândul fumătorilor decât în cele a nefumătorilor, ratele fumătorilor împătimişi fiind de 4 ori mai ridicate decât cele ale nefumătorilor. Fumatul ţigărilor este cea mai importantă cauză preventivă de deces în U.S. 430.000 morţi anuale sunt atribuite fumatului de ţigări.

8. Substanţe cancerigene.

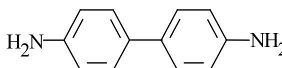
În grupa acesta au fost incluse unele medicamente clorambucilul şi ciclofosfamida şi alte substanţe chimice: amestecuri analgezice care conţin fenacetină; azatioprina; 1,4-butandioldimetan-sulfonat (Mileran); asociaţii chimioterapice utilizate în tratamentul limfoamelor (Metotrexat, Oncovin, Procarbazină şi Prednison); estrogeni conjugaţi; treosulfan; metoxalen, etc. Expunerea profesională la azbest determină creşterea incidenţei cancerului pulmonar, precum şi un risc crescut al apariţiei cancerului gastro-intestinal şi al laringelui. Toate tipurile de fibre de azbest testate sunt cancerigene la şoarece, şobolan, hamster şi iepure producând mezotelioame şi cancer pulmonar după inhalare, administrare intrapleurală, intratraheală şi intraperitoneală.

Diferiţi *compuşi ai cromului* (oxid cromic, bioxidul de crom, trioxidul de crom, cromatul de calciu) au indus tumori pulmonare sau sarcoame la şobolani.

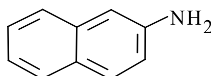
4-Aminobifenilul, antioxidant în industria cauciucului, este cancerigen asupra vezicii urinare la şoarece, şobolan, iepure şi câine. La om s-a observat creşterea incidenţei cancerului de vezică la muncitorii expuşi profesional la această substanţă.



Benzidina este cancerigenă la şoarece, şobolan, hamster şi câine, inducând carcinoame ale vezicii urinare şi tumori hepatice. Studiile epidemiologice au demonstrat o strânsă legătură între expunerea profesională la benzidină şi creşterea incidenţei cancerului de vezică urinară.



2-Naftilamina, administrată peroral, induce carcinoame ale vezicii urinare la câine şi maimuţă, iar în doză mare la hamster. La şobolan şi iepure, efectul său cancerigen este slab sau chiar nul. Se pare că există o legătură cauzală între expunerea la 2-naftilamină şi incidenţa cancerului vezicii urinare.



Bis(clormetil)eterul (BCME) ($ClOH_2OCH_2Cl$), clormetilmetileterul (CMME) ($ClCH_2OCH_3$) sunt agenţi de clormetilare. BCME este cancerigen la şoareci şi şobolan prin inhalare şi administrare subcutanată. CMME induce sarcoame la şoarece după administrare

subcutanată. Incidența cancerului pulmonar creşte direct proporțional la muncitorii expuşi la BCME şi CMME.

Iperita, $S(CH_2CH_2Cl)_2$ este induce tumori pulmonare după inhalare sau injectare intravenoasă şi sarcoame locale după injectare subcutanată. La om s-a constatat o creştere a mortalității prin cancer al căilor respiratorii la subiecții expuşi cronic la această substanță.

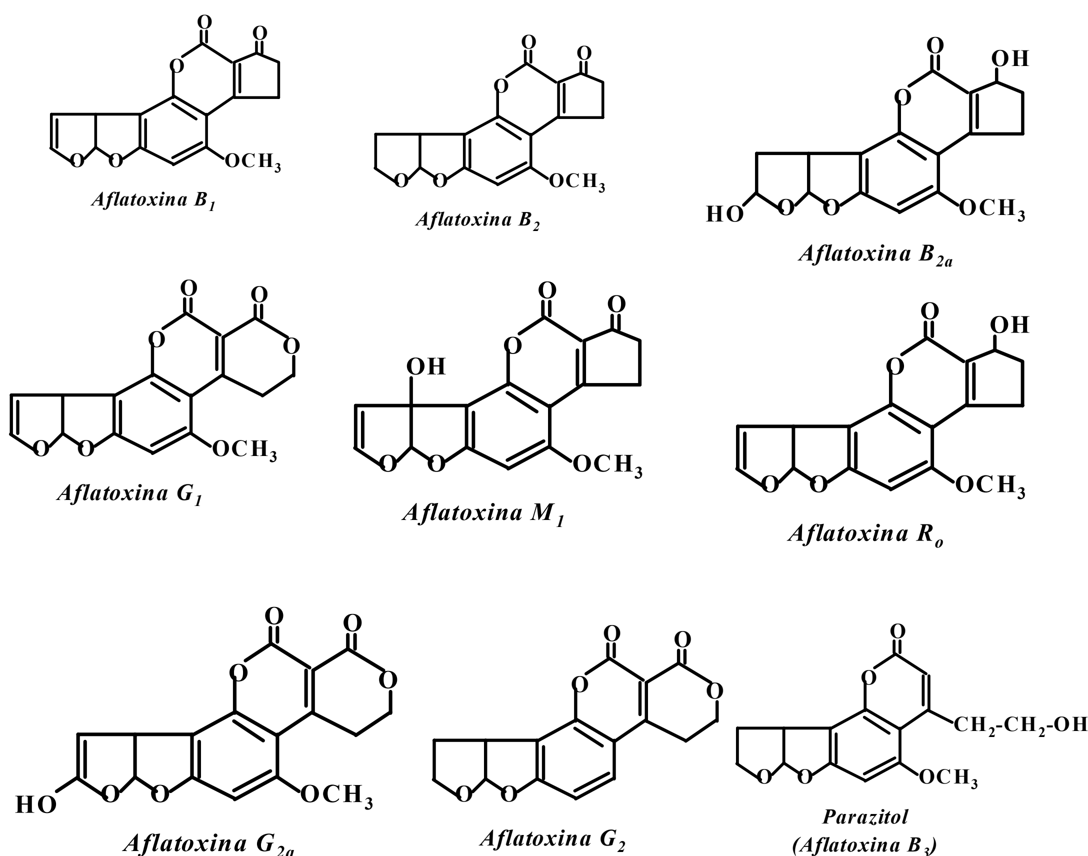
Clorura de vinil ($H_2C{=}CHCl$), administrată peroral sau prin inhalații, induce carcinom pulmonar, mamar, angiosarcom al ficatului la şoarece şi şobolan.

Aflatoxinele s-au găsit în mucegaiul *Aspergilus flavus*. Aflatoxinele sunt toxice la şoarece, şobolan, peşte, rață şi maimuță, administrate pe mai multe căi, inclusiv calea orală şi induc în special cancer hepatic, de colon şi rinichi.

Au fost denumite B (blue) de la fluorescența albastră pe care o emit în lumină ultravioletă, respectiv G (green) de la fluorescența verzuie, iar în funcție de originea apariției pe cromatogramele în strat subțire, s-au împărțit în aflatoxine B_1, B_2, respectiv, G_1, G_2. La om există o corelație pozitivă între media concentrației aflatoxinelor din dieta populației şi incidența cancerului primitiv hepatic.

Aflatoxinele sunt substanțe cristaline alb-gălbui. În u.v. emit fluorescență albastră sau verzuie; toate prezintă absorbție la 363 nm. Sunt substanțe insolubile în apă şi solvenți nepolari.

Aflatoxine produc liniile de *Aspergillus flavus* şi unii fungi ca: *Aspergillus parasiticus, A. niger, A. ruber, A. weniti, A. spp., Penicilium puberulum, P. frequentas, P. citricum* etc., în condiții corespunzătoare de temperatură şi umiditate, pe substraturi de arahide şi, în general, de plante oleaginoase. S-ar părea că aproape toate alimentele stocate în condiții specifice de umiditate şi temperatură pot fi contaminate cu aflatoxine.



Toxicitatea aflatoxinelor. Sunt substanțe toxice acute la cele mai multe specii, dar ele au o susceptibilitate variată, în funcție de specie, sex, vârstă.

Aflatoxinele B_1 şi G_1 în doze unice sunt letale şi au o acțiune relativ similară: la rățuşte de 50 g, DL_{50} este de 18,2 mg B_1 şi 39,2 mg G_1. Similar la şobolanii masculi DL_{50} este de 7,2 mg B_1/kg i.p. şi 14 mg G_1/kg i.p. Aflatoxinele B_2 şi G_2 au o acțiune mai slabă la rățuşte (DL_{50} = 1,76 mg B_2/kg şi, respectiv, 2,83 mg G_2/kg) şi sunt netoxice la şobolani la doze de 200 mg/kg.

Toxicitatea aflatoxinelor descreşte în ordinea: $B_1>G_1>B_2>G_2$.

Carcinogenitatea aflatoxinelor. Lancaster, în 1961, prezintă acțiunea cancerigenă a făinei de arahide asupra şobolanilor. S-a observat o relație lineară doză-răspuns în inducerea. Astfel, incidența carcinoamelor hepatice induse de făina de arahide conținând 0,5 ppm (mg/kg făină) aflatoxină este de 100% şi pentru 0,1 ppm de 50% la şobolanii masculi, iar la femele pentru 0,5 ppm se observă o incidență de 80%, iar pentru 0,1 ppm o incidență de aproximativ 17%.

Aflatoxina B_1 pură determină, la concentrații de 0,015 ppm în dietă, tumori în proporție de 100% atât pentru şobolanii masculi, cât şi pentru femele.

Aflatoxina are o acțiune cancerigenă transplacentară; puii de şobolan fac hepatoame, dacă mamele sunt hrănite cu mâncare conținând aflatoxină, în perioada de gestație. Aflatoxina B_1 este cel mai puternic hepatocancerigen cunoscut. Deşi sensibilitatea în cadrul speciilor variază, toate speciile animale tratate cu aflatoxină B_1 fac tumori la ficat.

Metabolismul. Metabolizarea aflatoxinelor se realizează în microzomii hepatici. Şoarecele metabolizează integral aflatoxina B_1 la produşi netoxici şi aflatoxină M_1, în timp ce şobolanul poate metaboliza aflatoxina B_1 doar la aflatoxină M_1 care este un cancerigen ultim pentru această specie.

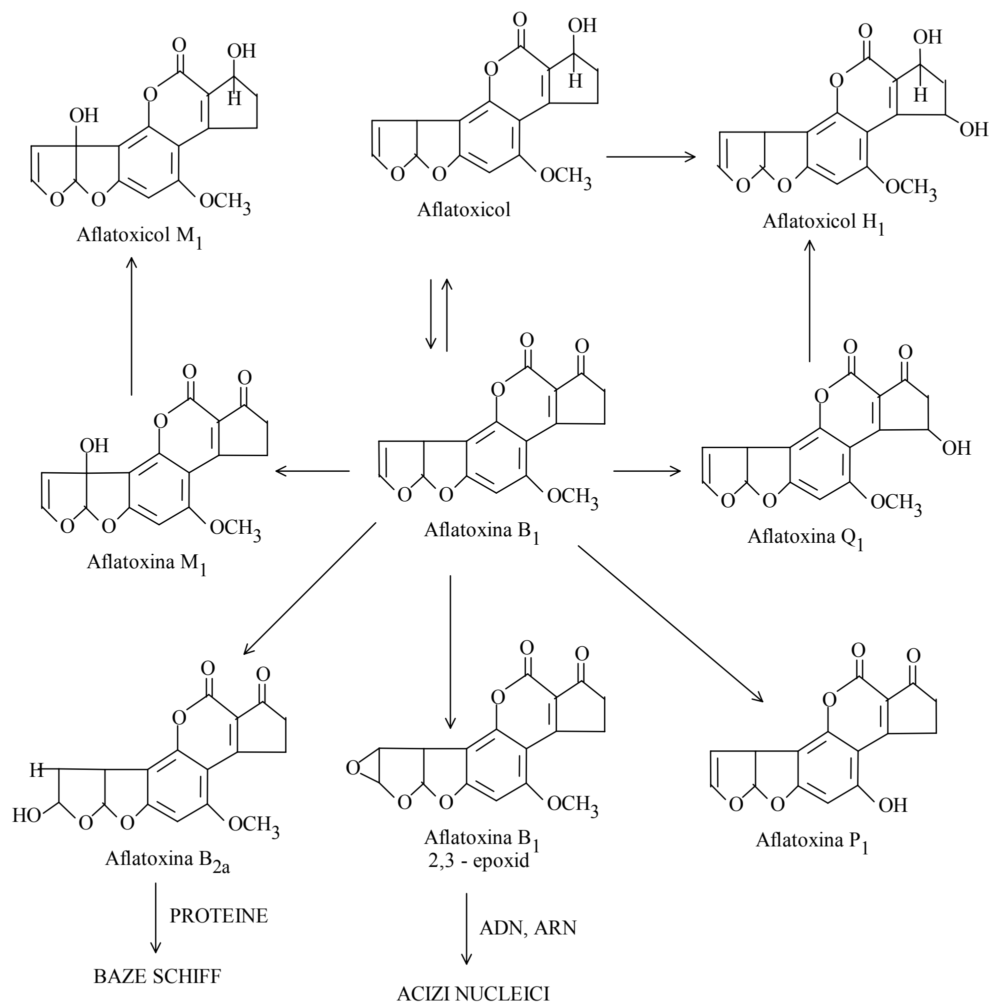
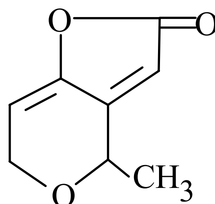


Fig. 16. Metabolizarea aflatoxinei B_1

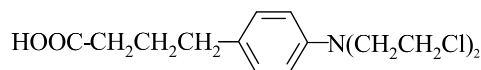
Patulina ($C_7H_6O_4$). Substanța pură se prezintă sub formă de prisme sau plăci incolore, este solubilă în apă şi solvenți organici uzuali, cu excepția eterului de petrol. Este produsul de metabolism al unor specii de ciuperci şi anume: *Penicillium claviforme, P. patulum, P. expansum, Aspergillus clavatus, A. giganteus* etc.



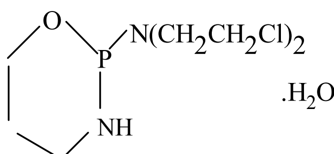
DL_{50} la şoareci a fost de 15 mg/kilocorp prin injecții subcutanate, 25 mg/kilocorp prin injecții intravenoase, 5 mg/kilocorp prin injecții intraperitoneale şi aproximativ 35

mg/kilocorp prin administrare perorală. Prin administrarea patulinei s-au obținut sarcoame la şobolani, la locul injecției subcutanate după 69 săptămâni**.**

Medicamente: Clorambucilul este un medicament antineoplazic aplicat în tratamentul unor leucemii şi limfoame. Administrarea sa intraperitoneală induce limfoame la şobolani şi limfosarcoame şi tumori ovariene şi pulmonare la şoarece. Au fost relatate cazuri de leucemie şi cancer renal la bolnavii tratați cu clorambucil.



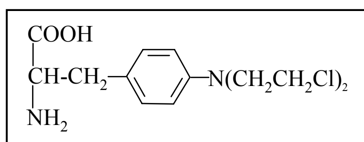
Ciclofosfamida (Endoxan, Clafen) este mult utilizată în tratamentul cancerului şi ca agent imunosupresor (artrită reumatoidă, lupus eritematos, pneumonie interstițială cronică). Administrată în doze similare cu cele folosite în clinica umană, ciclofosfamida induce la şoareci şi şobolani tumori pulmonare, limforeticuloame, tumori hepatice, ale organelor de reproducere, sarcoame şi carcinoame, tumori ale vezicii urinare.



Clornafazina (N,N-bis (2-cloretil)-2-naftil-amina) remediu antineoplazic. La animale induce tumori pulmonare după administrare intraperitoneală (şoarece) şi sarcoame locale (şobolan) după injectare subcutanat.



La om creşte incidența cancerului de vezică urinară la bolnavii cu policitemia vera tratați cu clornafazină.



Melfalanul (Sarcolizina) este utilizat în clinica umană ca agent antineoplazic în tratamentul mielomului multiplu, melanomului malign, adenocarcinomului de ovar. La şoareci a provocat cancer pulmonar şi sarcoame, iar la şobolani fibrosarcoame mamare. La om au fost semnalate cazuri de cancere secundare, în special leucemii acute, la bolnavii tratați cu melfalan pentru o altă tumoare primară (Einhorn, 1978).

Tetraclorura de carbon (CCl_4) este cancerigenă, inducând tumori hepatice asociate cu ciroză. *Dimetilsulfatul* [$(CH_3)_2SO_4$], utilizat în industria farmaceutică, este cancerogen după inhalare. *Amitrolul*, un erbicid, administrat peroral sau în injecții subcutanate induce tumori tiroidiene şi hepatice la şoarece şi şobolan. La om creşte riscul, diferențele fiind statistic semnificative.

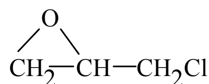
Derivați policlorurați ai difenilului sunt cancerigeni la şoarece şi şobolan după administrare pe cale orală, inducând tumori hepatice. La om creşte incidența melanomului malign la cei expuşi.

Beriliul şi compuşii acestuia sub formă de pulbere de sulfat de beriliu, minereu de beriliu şi bertrandită au indus tumori pulmonare la şobolani în urma inhalării acestora. Prin

administrare intravenoasă de silicat de beriliu şi zinc, fosfat de beriliu şi beriliu metalic s-au obținut tumori osoase la iepuri.

Alte substanțe probabil cancerigene: dicarbazina; procarbazina; bis-clormetilnitrozourea; 1-(2-cloretil)-3-ciclohexil-1-nitrozourea etc.

Epiclorhidrina este un solvent pentru răşinile naturale şi sintetice. Injectată subcutanat la şoarece, induce sarcoame locale. La om s-a constatat o creştere a mortalității prin cancer al căilor respiratorii şi leucemii la muncitorii expuşi prin profesie la această substanță, dar creşterea este nesemnificativă statistic.

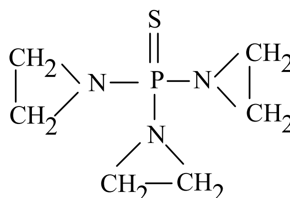


Tricloretilena ($Cl_2C{=}CHCl$), solvent, este cancerigenă la şoarece; după administrare perorală induce carcinom hepato-celular şi tumori pulmonare.

Stirenul induce tumori pulmonare la şoarece după administrare perorală. La oamenii expuşi profesional la stiren, benzen şi butadienă au fost semnalate cazuri de leucemie şi limfom.

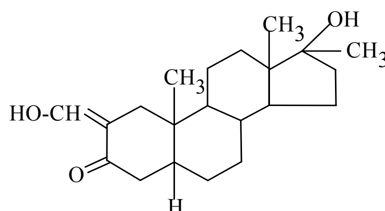
Plumbul şi sărurile de plumb conduc la tumori renale benigne şi maligne la şobolani.

Medicamente: *Tio-TEPA* (Trietilen-tiofosfamida) este un antineoplazic folosit în tratamentul adenocarcinomului mamar şi ovarian, limfoamelor maligne, carcinomului bronşic, etc. Este cancerigenă la şoareci şi şobolani. La om au fost raportate unele cazuri de leucemie în urma tratamentului cu Tio-TEPA.

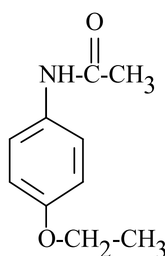


Fier-dextranul, medicament utilizat în tratamentul anemiei feriprive, induce tumori locale după injectare subcutanată şi intramusculară.

Oximetolona, medicament anabolizant, provoacă tumori hepatice la bolnavii tratați cu această substanță, singură sau asociată cu alte medicamente androgene. Există riscul unei terapii îndelungate cu acest medicament în clinică**.**



Fenacetina, medicament antipiretic şi analgezic, dezvoltă tumori ale căilor urinare şi nazale la şobolan. N-hidroxi-fenacetina, un m etabolit al acesteia, induce carcinoame hepatice după administrare perorală la şobolani.



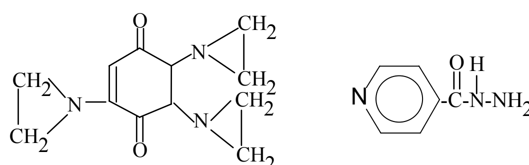
La om fenacetina induce necroză papilară a rinichiului, care ar putea degenera în cancer.

Fenitoina, utilizată în tratamentul epilepsiei şi al tulburărilor psihomotorii, s-a dovedit a fi cancerigenă la şoarece după administrare intraperitoneală sau perorală, inducând limfoame şi leucemii.

La om s-a constatat o relaţie între apariţia limfoamelor şi chimioterapia anticonvulsivantă pe termen lung cu fenitoină. Fenobarbitalul este cancerigen la şoareci şi şobolani.

Izoniazida este utilizată în clinica umană ca agent tuberculostatic. Induce cancer la şoarece, după administrare perorală, subcutanată sau intraperitoneală.

Triazichinona este un medicament antineoplazic. Induce o varietate de tumori maligne după administrare intravenoasă şi intraperitoneală la şobolani.



Inducerea tumorii. Oncogeneza este de regulă un proces multistadial, determinat de agenţii cancerigeni şi influenţat de promotori tumorali. administrarea unei doze unice, sub pragul cancerigen, dintr-o substanţă sigur cancerigenă, pe pielea animalelor de experienţă induce modificări în câteva celule, care nu sunt perceptibile dacă tratamentul cu agentul cancerigen nu se continuă, neconducând la dezvoltarea tumorii. Această primă etapă a cancerogenezei chimice a fost denumită "iniţiere" şi poate fi efectuată numai de către o substanţă chimică sigur cancerigenă.

Etapa a doua a cancerogenezei chimice — promovarea — favorizează exprimarea modificărilor care rezultă în decursul procesului de iniţiere. Promovarea are loc după o perioadă de săptămâni sau luni de la acţiunea de iniţiere a agentului cancerigen; ea nu este ireversibilă, ci mai degrabă poate fi reversată în anumite împrejurări. Cancerigenii compleţi induc ambele etape ale cancerogenezei, iniţierea şi promovarea.

Administrarea unică a 7,12-dimetilbenzantracenului (DMBA), cancerigen complet, urmată de aplicarea repetată a unui promotor duce la dezvoltarea unui număr tot atât de mare de tumori şi necesită o cantitate de 20 de ori mai mică de DMBA decât dacă s-ar administra singur.

Se admite că tumorile nu sunt exclusiv consecinţa inevitabilă a unei leziuni genetice şi, în consecinţă, prevenirea cancerului trebuie să fie îndreptată atât în direcţia îndepărtării

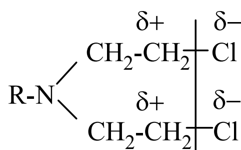
substanțelor cancerigene (inițiatori) sau împiedicării metabolizării lor în organism la produşi mai activi (electrofili), cât şi a evitării expunerii repetate la substanțe cu rol promotor.

Metabolizare şi cancerizare. Observații mai vechi au sugerat că metabolizarea substanțelor chimice cancerigene <u>in vivo</u> ar constitui factorul cheie în explicarea acțiunii lor cancerigene.

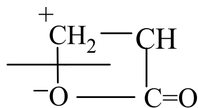
S-a demonstrat legarea covalentă a unui metabolit al dimetil-azobenzenului (DAB) la proteinele hepatice solubile la şobolanii hrăniți cu acest colorant. Se formează complecşi între derivații unor amine aromatice (2-acetilaminofluoren ─ AAF), precum şi a altor clase de substanțe chimice cancerigene (hidrocarburi aromatice policiclice) şi proteinele țesuturilor țintă (ficat, piele).

S-au mai identificat aducți ai derivaților cancerigenilor chimici cu DNA, ARN şi proteine în țesuturile țintă. Majoritatea cancerigenilor chimici sunt activi numai după activarea metabolică în organism la cancerigeni ultimi. Excepție fac substanțele chimice alchilante şi acilante, care sunt electrofile în forma lor naturală, putând să efectueze legături chimice cu macromoleculele celulare.

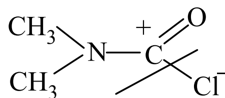
Agenți alchilanți



Gaz mustar



β-propiolactona



Clorura de dimetilcarbamoil

Datele experimentale susțin că formele ultime ale cancerigenilor chimici sunt reactanți electrofili puternici. În felul acesta, substanțe chimice cu structuri diferite ajung prin activare metabolică în organism la metaboliți activi, care au ca trăsătură comună electrofilia. Cancerigenii ultimi conțin în molecula lor atomi deficitari în electroni, care pot să reacționeze cu centrii nucleofili, adică cu atomi care posedă o pereche de electroni capabili să formeze o legătură chimică. Astfel de centri nucleofili întâlnim în macromoleculele celulare, cum ar fi acizii nucleici (atomi de azot, carbon şi oxigen) şi proteine (atomi de azot, sulf şi oxigen).

Activitatea biochimică a cancerigenilor chimici în organism este inițiată de sistemele enzimatice şi anume de oxidaze cu funcție mixtă, dependente sau nu de citocromul P_{450}, existente în microzomi.

Cancerigenii ultimi odată formați, reacționează, de obicei neenzimatic, cu centrii nucleofili din macromoleculele celulare <u>in vivo</u>. Interesul deosebit pentru aceşti derivați îl constituie interacțiunile covalente ale acestor reactanți electrofili cu macromoleculele informaționale DNA, ARN şi proteine. Deoarece cei mai mulți dintre cancerigenii chimici sunt metabolizați în organism la mai mult decât un tip de cancerigen ultim şi pentru că sunt mai mulți centri nucleofili în fiecare macromoleculă, există posibilitatea formării mai multor complecşi cu DNA, ARN şi proteine pentru fiecare cancerigen ultim în parte. De aceea, nu se poate şti care din aceşti complecşi sunt mai importanți pentru cancerogeneză.

Activarea metabolică a aminelor şi amidelor aromatice

Cancerogenitatea aminelor şi amidelor aromatice depinde de transformarea lor în organism în derivaţi N-hidroxilaţi şi convertirea mai departe a acestora la metaboliţi mai reactivi, care se leagă covalent la centrii nucleofili din macromoleculele celulare.

2-Acetil-aminofluorenul (AAF)

Şobolanii hrăniţi cu AAF excretă prin urină un metabolit al acestuia, N-hidroxi-2-acetilamino-fluorenul, a cărui concentraţie creşte proporţional cu cantitatea de AAF administrată. Metabolitul este un cancerigen mai puternic decât compusul de origine.

Studiile efectuate *in vivo* cu izotopi marcaţi au arătat că administrarea ambilor produşi (AAF şi N-hidroxi-AAF) la şobolani conduce la formarea de aducţi cu acizii nucleici şi proteinele hepatice, care au fost evidenţiaţi şi separaţi prin tehnici cromatografice din ficatul acestor animale. *In vitro*, aceeaşi compuşi nu formează aducţi cu acizii nucleici şi proteinele. S-a ajuns astfel la supoziţia că N-hidroxi-AAF ar suferi o nouă activare în organism, etapa secundară de activare metabolică ce duce la derivaţi electrofili mai puternici, ce reacţionează cu centrii nucleofili din macromoleculele celulare.

S-a demonstrat (King şi Olive, 1975) că activitatea N-hidroxi-AAF în ficat are loc sub acţiunea unei enzime localizată în citosolul acestei celule cu formarea esterului sulfuric al N-hidroxi-AAF, considerat cancerigenul ultim major al N-hidroxi-AAF în ficatul de şobolan. S-a ajuns la concluzia că ar exista o corelaţie între activitatea sulfotransferazei hepatice şi susceptibilitatea animalelor hrănite cu AAF de a dezvolta tumori hepatice.

Cu toate acestea, s-a mai găsit că există şi alţi derivaţi ai N-hidroxi-AAF care şi ei sunt foarte activi atât din punct de vedere cancerigen, cât şi mutagen. N-hidroxi-2-acetil-aminofluorenul suferă o oxidare catalizată de o peroxidază cu formarea unui radical nitroxid liber. Doi asemenea radicali pot, prin dismutare, să formeze N-acetoxi-2-aminofluorenul, un reactant electrofil puternic şi 2-nitrozofluorenul, inactiv.

Activarea aminelor şi amidelor aromatice depinde de convertirea lor la compuşi N-hidroxilaţi. Metaboliţii ultimi cancerigeni nu au putut fi identificaţi în toate cazurile şi de asemenea reacţiile intermediare care conduc la aceşti metaboliţi ultimi diferă în funcţie de substituenţii aril, de ţesut sau de specie.

Metabolismul coloranţilor aminoazoici. Metabolizarea N-metil-4-aminoazobenzenului (MAB) are loc la derivaţi N-hidroxilaţi urmată de convertirea acestora la esteri ai acidului sulfuric. Oxidarea coloranţilor aminoazoici în organism este catalizată de o oxidază microzomială flavo-proteică, independentă de citocromul P_{450}, deosebindu-se astfel de cea care hidroxilează AAF.

Activarea în continuare a coloranţilor aminoazoici se face sub acţiunea sulfotransferazei, care are specificitate de substrat, deosebindu-se astfel de cea care activează 2-acetilaminofluorenul. Esterii sulfurici formaţi sunt reactanţi electrofili puternici şi formează aducţi cu AAND substituţia făcându-se ca şi în cazul AAF la C_8 al guaninei (aductul principal) şi N_2 al acesteia.

Metabolismul 2-naftilaminei şi 4-aminodifenilului. Prin instilări repetate cu N-hidroxi-2-naftilamină în vezica urinară la câine, apar tumori în acest organ. S-a constatat de asemenea o strânsă corelație între gradul de cancerogenitate al 1-naftilaminei (necancerigenă ca atare), 2-naftilaminei şi 4-aminodifenilului, cu producerea methemoglobinei (care măsoară N-hidroxilarea acestora în sânge) şi concentrația produşilor N-hidroxilați în urină. S-ar părea că N-hidroxilarea acestor arilamine ar fi factorul molecular cheie în producerea cancerului de vezică urinară.

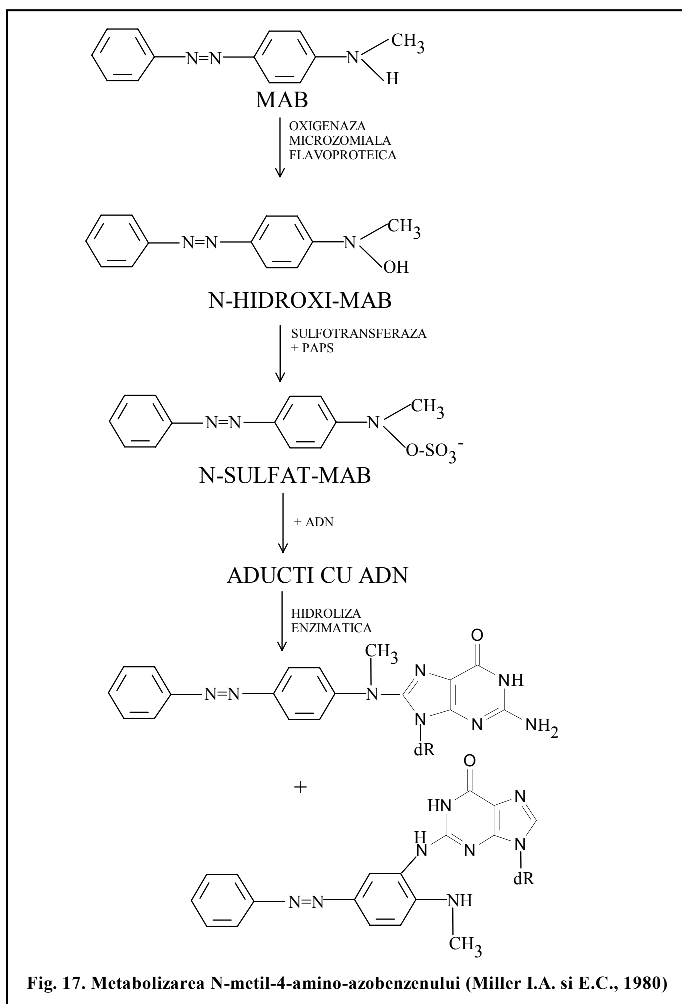


Fig. 17. Metabolizarea N-metil-4-amino-azobenzenului (Miller I.A. si E.C., 1980)

Mecanismul probabil al producerii cancerului de către 2-naftilamină şi 4-aminodifenil ar fi următorul: aceşti compuşi sunt N-hidroxilați în ficat sub acțiunea oxigenazelor mixte dependente de citocromul P_{450} şi conjugați apoi tot în ficat cu acid glucuronic. Din ficat, sunt transportați sub formă inactivă şi solubilă prin sânge, ajungând în vezica urinară. Aici, glucuronoconjugații hidrolizează în mediul slab acid al urinei sau sub acțiunea β-glucuronidazei urinare, punând în libertate compusul activ N-hidroxilat. În mediul urinar acid compuşii hidroxilați conduc la ioni de arilnitreniu, care sunt probabil cancerigenii ultimi responsabili de inducerea cancerului vezicii.

Există o corelație cantitativă între cancerogenitatea 1-naftilaminei, 2-naftilaminei şi 4-aminodifenilului pentru vezica urinară la câine cu nivelul excreției N-hidroxilaminelor corespunzătoare. Argumente în plus în acest sens sunt aduse de experiențe care au indus

carcinoame ale vezicii urinare prin instilații cu N-hidroxi-2-naftilamină, dar nu şi cu 2-naftilamină. Rolul metaboliților urinari ai 2-naftilaminei în inducerea cancerului vezicii urinare la câine a fost bine ilustrat de cercetările care protejând epiteliul vezicii urinare de contactul cu urina nu dezvoltă tumori, în timp ce epiteliul vezicii expus la urină se transformă neoplazic (Kadlubar şi colab., 1977). Formarea *in vitro* a N-glucuronidelor stabile din N-hidroxi-arilamine permite izolarea acestor complecşi în cantități suficient de mari.

Amidele şi aminele aromatice inițiază formarea tumorii prin modificarea macromoleculelor țesutului țintă. Într-o primă etapă, acestea sunt N-hidroxilate, pentru ca ulterior să formeze derivați electrofili puternici, capabili să reacționeze cu macromoleculele celulare, acizii nucleici şi proteinele. Aceşti derivați electrofili fiind reactivi sunt şi foarte instabili, fapt ce limitează distanța la care pot să-şi exercite proprietățile cancerigene.

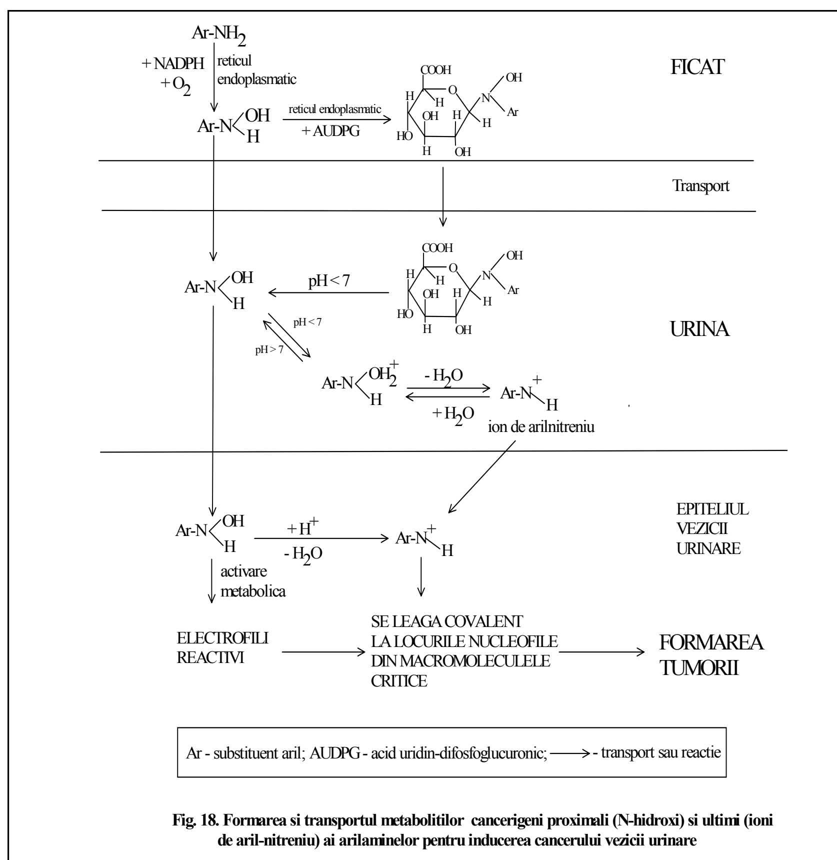


Fig. 18. Formarea si transportul metabolitilor cancerigeni proximali (N-hidroxi) si ultimi (ioni de aril-nitreniu) ai arilaminelor pentru inducerea cancerului vezicii urinare

În cazul 2-acetil-aminofluorenului, cancerizarea presupune substituirea ADN cu fragmente de 2-AAF la C_8 al guaninei. Există opinia că la formarea aductului, guanina suferă o rotație în afara dublului helix, fragmentul de fluoren înserându-se astfel în interiorul helixului. Acest model este în acord cu substituția perechilor de baze şi deleția mutanților. Aceste substituții conduc în final la modificări în transcripția informației genetice.

Donorii de grupe alchil

Dialchil-nitrozaminele, dialchil-hidrazinele, aril-dialchil-triazenele, alchil-nitrozamidele, alchil-nitrozimidele, etc. sunt donori de grupe $-CH_3$ şi $-C_2H_5$.

Dialchil-nitrozaminele sunt activate prin oxidarea unei grupe alchil de către sisteme monooxigenazice dependente de citocromul P_{450} din reticulul endoplasmatic alcelulelor corespunzătoare (Michejda şi colab.,1980). Derivații monoalchil formați se descompun spontan la ionii monoalchil-diazoniu, foarte reactivi.

N-nitrozamidele şi N-nitrozimidele pot fi activate neenzimatic prin reacția lor cu H_2O sau alte grupări nucleofile (─SH, ─NH_2), conducând la formarea aceloraşi intermediari monoalchil-diazoniu. Se obțin numeroşi complecşi metilați ai acizilor nucleici şi proteinelor în țesuturile țintă. Metilarea poate avea loc în diferite poziții nucleofile: O_6 la guanină, N_7 la guanină, N_3 la adenină etc.; N_1 şi N_2 la histidină, S_1 la cisteină etc.

Asemănător cu dialchil-nitrozaminele, 1,2-dialchil-hidrazinele şi aril-dialchil-triazenele sunt convertite în reticulul endoplasmatic de monooxigenaze mixte dependente de citocromul P_{450} tot la agenți alchilanți puternici.

Metabolismul aflatoxinelor

Există o legătură între toxicitatea, mutagenitatea şi cancerogenitatea aflatoxinei B_1 şi dubla legătură din inelul furanic terminal. Astfel, aflatoxina B_2, căreia îi lipseşte această dublă legătură, este mult mai puțin activă decât aflatoxina B_1 în experiențele pe animale. În plus, toxicitatea şi mutagenitatea aflatoxinei B_1 pentru *Salmonella typhymurium* este dependentă de adăugarea preparatelor care conțin un sistem enzimatic monooxigenazic dependent de citocromul P_{450}. De aici rezultă că epoxidul aflatoxinei B_1 poate fi metabolitul ultim activ din punct de vedere biologic. S-a izolat 2,3-dihidro-2,3-dihidroxi-aflatoxina B_1(dihidro-diol) dintr-un hidrolizat acid al aductului rARN-aflatoxină B_1, format prin oxidarea microzomială a aflatoxinei B_1 în prezența rARN. De asemenea, s-a evidențiat un derivat similar în ficatul şobolanilor hrăniți cu aflatoxină B_1 tritiată. Aceste două cercetări sugerează epoxidarea aflatoxinei B_1 *in vivo*, cu formarea 2,3-epoxidului aflatoxinei B_1, cancerigen ultim foarte activ.

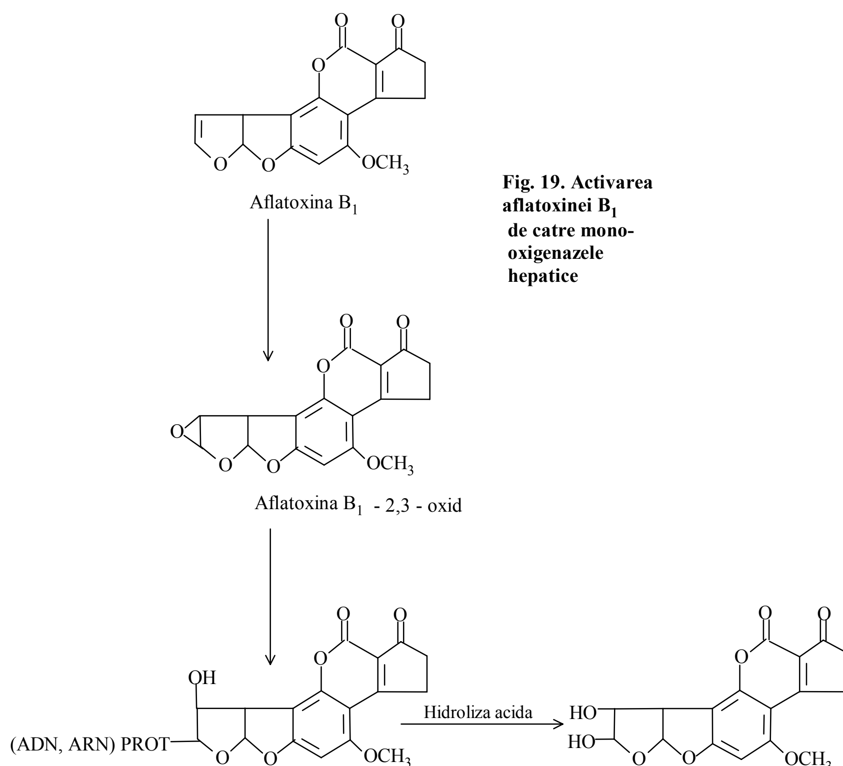


Fig. 19. Activarea aflatoxinei B_1 de catre mono-oxigenazele hepatice

Aflatoxina B_2 conferă numai 1% din cantitatea de aducți cu rARN şi AND obținuți în cazul administrării aflatoxinei B_1. Pentru ca aflatoxina B_2 să devină activă, trebuie să se transforme enzimatic în aflatoxină B_1, care la rândul ei urmează calea de activare metabolică la 2,3-epoxid. Pe de altă parte, nu s-a reuşit sinteza 2,3-oxidului aflatoxinei B_1, probabil din cauza marii reactivități şi instabilității acestuia. S-a arătat însă că 2,3-diclorura aflatoxinei B_1 sintetizată ca un model pentru 2,3-oxidul aflatoxinei B_1 manifestă o mare putere cancerigenă şi mutagenă ca atare, fără să necesite o activare metabolică.

Se considera că o hidrocarbură este cancerigenă dacă posedă o "regiune K" cu o densitate mare de electroni.În această regiune din hidrocarbură are loc adiția electrofilă cu formare de compuşi fenolici.

Conform teoriei soților Pullmann, numai hidrocarburile aromatice policiclice care au în regiunea K o densitate de electroni π mai mare de 1,283 au efecte cancerigene.

Majoritatea substanțelor chimice îşi manifestă acțiunea cancerigenă după metabolizare în organism sub acțiunea unor sisteme enzimatice de oxigenaze mixte la metaboliți mai reactivi. Aceştia reacționează cu centrii nucleofili din macromoleculele celulare, AND, ARN şi proteine. Deoarece hidrocarburile aromatice policiclice sunt o clasă de substanțe relativ inerte, s-a presupus că un grup de metaboliți mai reactivi ai acestora sunt responsabili de activitatea lor cancerigenă. Plecând de la existența unei regiuni foarte reactive (regiunea K) în hidrocarburile aromatice policiclice cancerigene, a fost firesc ca primii epoxizi testați pentru acțiunea lor cancerigenă şi mutagenă să fie epoxizii formați în regiunea K. Slaba cancerogenitate a multor epoxizi ai regiunii K în benzantracen sau în hidrocarburi înrudite cu acesta n-au confirmat această ipoteză. Totuşi, aceşti epoxizi s-au dovedit a fi cancerigeni mai puternici decât hidrocarburile corespunzătoare în culturi de celule.

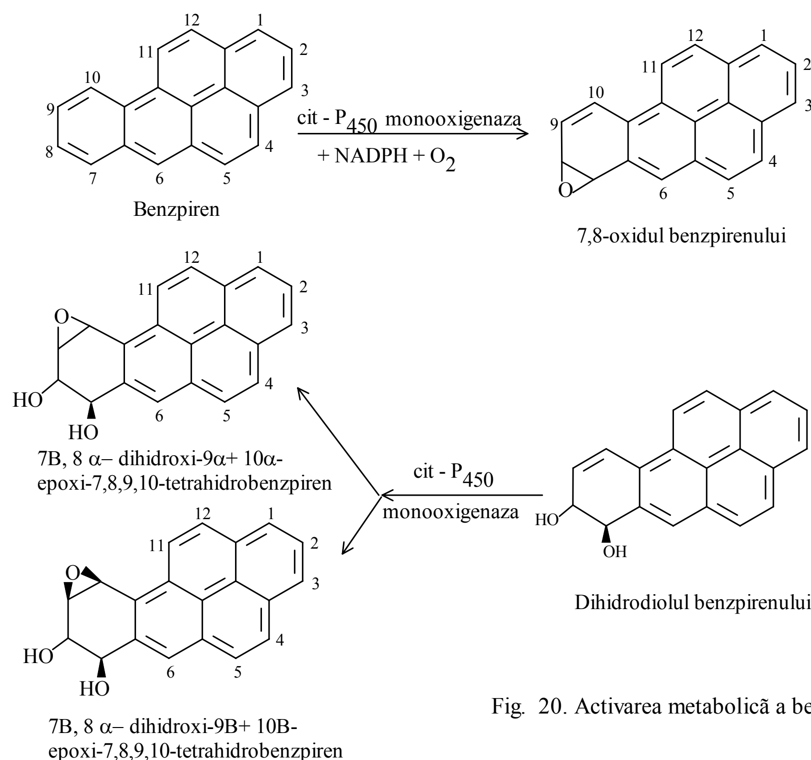


Fig. 20. Activarea metabolică a benzpirenului.

Cancerigenul ultim al benzpirenului este 7-beta-8-alfa-dihidroxi-9-alfa-10-alfa-epoxi-7,8,9,10-tetrahidro-benzpirenul, electrofil, mutagen şi cancerigen. Produşii majori de reacţie ai acestor izomeri cu DNA implică gruparea 2-amino din guanidină şi C_{10} a epoxidului.

Epoxizii cancerigeni se formează într-o regiune a moleculei numită "golf" (bay region). Se afirmă astfel că această regiune s-ar găsi între poziţiile 4 şi 5 în fenantren, 1 şi 12 în benzantracen şi 10 şi 11 în benzpiren.

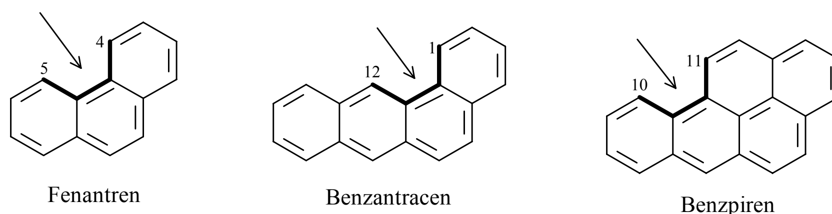
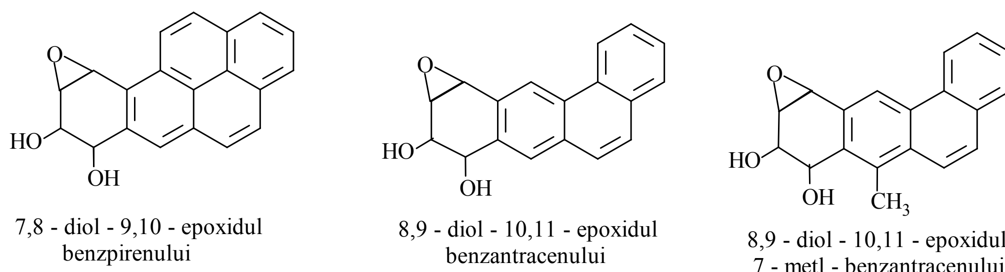


Fig. 21. Pozitia "bay region" in fenantren, benzantracen si benzpiren (Jerina D. M., 1978)

În consecinţă, se poate explica de ce dintre următorii epoxizi, numai 7,8-diol-9,10-epoxidul benzpirenului este cancerigen (realizat în regiunea "bay"):

S-au obţinut totuşi dovezi că se formează şi alţi metaboliţi cancerigeni în afara regiunii "golf".



9. Mecanismul cancerogenezei chimice

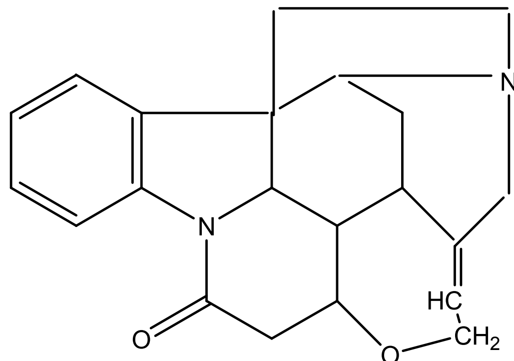
Mutația în DNA constituie etapa primară în inițierea cancerogenezei de către substanțele chimice cancerigene. Nu poate fi exclusă posibilitatea ca, în unele cazuri, modificări negenetice să constituie evenimente primare în cancerogeneză. Nu s-a demonstrat până acum rolul virusurilor oncogene în inițierea cancerogenezei prin substanțe chimice. Este, de asemenea, probabil ca o parte din reactanții electrofili să joace rol şi în promovare; numărul mare de aducți formați pentru acelaşi cancerigen atât cu DNA, cât şi cu ARN şi proteine sunt necesari unii pentru inițierea fenomenului de cancerogeneză şi alții în etapa de promovare a procesului de cancerizare.

Benzpirenul şi alte hidrocarburi aromatice policiclice cancerigene pot acționa ca un cancerigen complet, adică inițiază, dar şi promovează cancerogeneza chimică, atunci când se aplică repetat pe pielea animalelor de experiență; este posibil ca aceşti cancerigeni să poată induce anumite efecte asupra membranelor celulare, care sunt similare cu cele induse de forbolesteri, promotori tumorali. S-a confirmat că aceşti compuşi au efecte similare cu cele produse de 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetat (TPA), inclusiv creşterea turnoverului fosfolipidelor membranei.

S-a demonstrat că TPA intensifică transformarea celulelor induse de virusul polioma, Epstein-Barr, accelerează replicarea şi efectul citopat al unor virusuri oncogene: adenovirusuri, E-B, virusul tumorii mamare de şoarece ş. a. Totodată, benzpirenul şi metabolitul său mai reactiv, benzpiren-dihidrodiol-9,10-epoxidul, au efecte similare de inducere a replicării virusului polioma, chiar dacă au fost administrați o singură dată şi în ciuda faptului că aceşti compuşi sunt degradați rapid. Aceasta sugerează că aceşti cancerigeni chimici compleți pot induce unul sau mai mulți factori celulari care stimulează replicarea unor virusuri oncogene integrate în genomul celulei gazdă.

10. Toxicologie analitică

DETERMINAREA STRICNINEI ŞI BRUCINEI



A. Izolare:

1. Izolare din lichide biologice: Proba de analizat (20 ml) se alcalinizează cu hidroxid de sodiu 10%. Se extrage într-o pâlnie de separare de 2 ori cu câte 25 ml cloroform. Extractele cloroformice reunite se filtrează prin sulfat de sodiu anhidru şi se evaporă la sec pe B.M.

2. Izolare din organe

Din organe, stricnina se izolează prin metoda Stas-Otto-Ogier: din lichidul apos R alcalin prin extragere cu cloroform.

3. Izolarea stricninei în prezența brucinei:

Proba de analizat se tratează cu câțiva ml de acid sulfuric 5% se încălzeşte 20 minute pe B.M. la 50°C. Se adaugă peste soluția caldă 1-2 m acid azotic fumans şi se continuă încălzirea încă 10-15 minute. Brucina este transformată în cacotelină iar stricnina rămâne ca atare. Se alcalinizează cu amoniac concentrat şi se extrage de 2 ori cu câte 20 ml cloroform. În aceste condiții se extrage numai stricnina, cacotelina formată rămâne în soluția apoasă. Extractele cloroformice reunite sunt filtrate pe sulfat de sodiu anhidru şi evaporate la sec pe B.M., după care se execută reacțiile de identificare.

B. Identificare:

1. Reacții de precipitare:

a. Reziduul reluat cu 1-2 picături reactiv Bouchardat dă un precipitat brun -roşca (1 : 50000).

b. reziduul reluat cu 1-2 picături reactiv Dragendorff dă un precipitat galben - intens (1 : 250000).

c. Reziduul reluat cu 1-2 picături reactiv Mazer dă un precipitat alb (1 : 15000).

d. Reziduul reluat cu 1-2 picături de reactiv Hager dă cristale caracteristice în formă de dinți ferăstrău.

2. Reacții de culoare

a. Reacția Bauer: peste reziduu se adaugă o picătură de soluție de bicromat de potasiu 10% şi se evaporă la sec pe B.M. După răcire, reziduul se reia cu acid sulfuric bihidrat (90 g acid sulfuric concentrat + 36 g apă, după Dragendorff), apare o culoare violet fugace, care trece în roşu, apoi la incolor. Sensibilitatea reacției este de 1 µg. în loc de bicromat poate fi folosit alt oxidant (oxid de ceriu, bioxid de mangan, bioxid dec plumb). Reacția este împiedicată de prezența ptomainelor; dacă se foloseşte în loc de bicromat, fericianură de potasiu interferența este înlăturată.

O variantă a reacției Bauer este următoarea: peste reziduul de pe sticla de ceas, se adaugă câteva cristale de bicromat de potasiu şi 3-4 picături de acid sulfuric concentrat, dacă pe suprafața sticlei de ceas trasează linii cu o baghetă, în urma acesteia apar striuri violete care virează la roşu şi apoi dispar. Dacă purificarea nu a fost suficientă, colorația violetă este mascată de o colorație brună, datorită carbonizării substanțelor organice de către acidul sulfuric concentrat.

b. Reacția Malaquin (reacție tetrahidrostricninei): reziduul se reia cu 3-4 ml acid clorhidric concentrat si 1-2 granule de amalgam de zinc. Se fierbe câteva minute. După răcire, se decantează şi se trasează co o pictură de nitrat de sodiu 0,1% când apare o corelație roz-roşie, stabilă, colorimetrabilă. Nu se foloseşte acid clorhidric mai diluat şi nici nitrat de sodiu mai concentrat deoarece se degajează vapori nitroşi, care deranjează reacția de culoare.

Lichidul colorat prezintă la spectroscop, două benzi de absorbție în regiunea verde albastră a spectrului. Fenotiazinele interferă reacția, însă colorația roz, dată de acestea, apare imediat după adăugare de acid clorhidric şi dispare prin reducere cu amalgam de zinc reapărând, fugace, la tratarea cu nitrat de sodiu.

Observații: în locul nitritului de sodiu pot fi folosiți şi alți oxidanți ca: apa de brom, sulfat ceric.

c. Reactivul Mendelin dă o colorați albastră – violetă care virează în roşu prin adăugare de apă sau prin alcalinizare. Sensibilitatea reacției este de 1µg.

d. Cromatografie pe strat subțire:

Reziduul obținut prin evaporarea extractului cloroformic din medii biologice, se dezvoltă în 0,2-0,3 ml cloroform sau metanol.

- Faza staționară: Silicagel G. Merck.
- Faza mobilă: cloroform : metanol (8 : 2(v/v)
- Relevare: Reactiv Mandalin – spoturi violet.

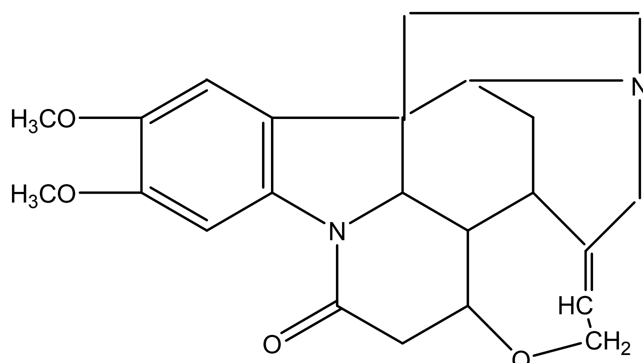
b. Reactiv Drangerdorff – spoturi portocalii.

Test fiziologic

O porțiune din reziduu se dizolvă într-o picătură acid clorhidric 10^{-2}N şi 0,5 ml apă distilată. Soluția obținută se injectează sub cutanat la broască. În cazul prezenței stricninei apar convulsii tonico- clonice şi animalul se aşează în poziție de opistotonus. Prin acest test se poate identifica 1µg de stricnină.

Fig.4.

Brucina



A. Izolare:

Brucina se izolează din soluții apoase alcaline prin extracția cu solvenți organici.

B. Identificare:

1. Reacții de precipitare:

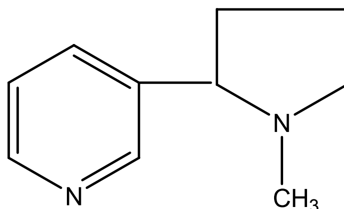
Reziduul reluat cu reactivi generali de precipitare ai alcaloizilor dau precipitate colorate.

Reziduul reluat cu bicromat de potasiu 10% dă un precipitat sub formă de buchet.

2. Reacții de culoare

a. Reacția Noll. reziduul se tratează cu 1-2 picături de acid azotic concentrat şi câteva picături de acid sulfuric concentrat când se obține o colorație roşie, care virează în portocaliu, apoi în galben prin formarea cacotelinei (hidrat de nitrobrucinchinonă). Dacă se tratează soluția galbenă de cacotelină cu clorură stanoasă sau sulfat de amoniu, apare o culoare violet.
b. Reacția cu clorat de potasiu: reziduul tratat cu câteva picături de acid formic 10% şi 2-3 cristale de clorat de potasiu, când se formează, la încălzire o colorație roşie.
c. Reacția cu apă de brom: reziduul tratat cu câteva picături de apă de brom şi evaporat la sec pe B.M. lasă un depozit roşu amorf de dibrombrucină.
d. Reziduul tratat cu reactiv Fröhde dă o colorație albastră violet (sens. 1μg.).

IV.1.5. <u>DETERMINAREA NICOTINEI</u>



A. <u>Iolare:</u>
a. <u>Izolare din organe,lichide biologice, soluții insecticide</u>:
Nicotina se izolează prin metoda Stas-Otto-Origer sau prin antrenare cu vapori de apă.
1. <u>Urina</u> alcalinizată la pH 11-12 cu hidroxid de sodiu 10% este supusă antrenării cu vapori. Se culege distilatul în puțin acid clorhidric 0,1 N. În aceste condiții nu sunt antrenați compuşi cu structură similară prezenți în mod normal în organidm (amida acidului nicotinic).
Urina alcalinizată la pH 11-12 cu hidroxid de sodiu 10% se extrage cu 10 ml cloroform de 2-3 ori. Extractele cloroformice reunite se tratează cu 1-2 picături acid clorhidric 0,1 N şi se evaporă la 40-50°C pebaie de apă.
2. <u>Izolare din aer</u>: se barbotează aerul prin acid sulfuric diluat.
3. <u>Izolare din tutun</u>: se macerează tutunul într-o soluție alcalină timp de 30 minute. Se filtrează şi se extrage cu cloroform. Se repetă extragerea de 2-3 ori. Extractele cloroformice reunite sunt evaporate. Se reia reziduul cu acid acetic 1% sau cu o soluție foarte diluată de etanol.
B. <u>Identificare</u>:
1. <u>Reacții de precipitare</u>:
Nicotina dă precipitate cu reactivi generali de precipitare al alcaloizilor. Reziduul tratat cu 2-3 picături de reactivii Bouchardat şi Drangendorff formează un precipitat brun-roşcat, roşu, iar, cu reactivul Sonnenschein un precipitat galben-portocaliu. În soluții mai concentrate se obține cu reactivul Hager, picrat de nicotină, precipitat galben sub formă de cristale cu p.t. 217°C.

2. Reacții de culoare:

a. Reacția Köning: se neutralizează cu 5 ml soluție de analizat cu acid acetic 10% sau acid clorhidric 10%. Se adaugă 1 ml soluție bromcian, proaspăt preparată şi se menține 2 minute pe baia de apă la 80°C. Se adaugă 3 ml soluție acetat de benzidină 1% şi 2 ml HCl 20%. Apare o colorație galbenă - portocalie, colorimetrabilă. Reacția este caracteristică nucleului piridinic, care sub acțiunea bromcianului se scindează cu formare de aldehidă glutaconică. Aceasta, prin condensare cu o amină primară, formează o aldehidă galben – portocalie. Sensibilitatea reacției este de câteva micrograme. Bromcianul se prepară adăugând peste apa saturată cu brom, o soluție de cianură de potasiu 10% până la decolorare. Pentru a elimina riscul legat de manipularea cianurii de potasiu, se poate utiliza , în loc de bromcian, bromtio9cian, preparat din tiocianat de potasiu, în loc de cianură de potasiu.

b. Reacția cu p-dimetil-amino-benzaldehidă; se tratează soluția de nicotină cu 1-2 ml soluție p-dimetil-amino-benzaldehidă 10% în acid clorhidric concentrat, când apare o colorație violetă.

3. Reacții microcristalografice

a. Reacția Roussin: se tratează reziduul dizolvat în eter cu o soluție eterică de iod 2-3 %. Se prepară un lichid uleios roşu-brun, din care, după câteva ore, apar cristale aciulare roşii – rubinii, transparente, de iod-nicotină. Hidrocianina, dă în, aceleaşi condiții, cristale brun închis.

b. Reacția Drangendorff, când se formează cristalele roşii – închis până la negru, cu aspect de: "păsări în zbor" vizibile la microscop. Sensibilitatea reacției este de 1 μg.

4. Cromatografie în strat subțire:

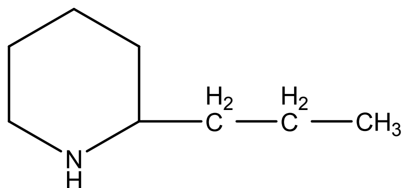
Se execută la cocaină. Rf. = 0,75

5. Test fiziologic:

Prin injectarea clorhidratului de nicotină în sacul limfatic al broaştei, se obține "poziția nicotinică" specifică, variind în raport cu doza administrată (fig.nr.5).

Fig.nr.5.

DETERMINAREA CONIINEI



A. Izolare:

Coniina se izolează din soluții apoase alcaline, cu solvenți organici sau prin antrenare cu vapori de apă.

B. Identificare:

1. reacții de precipitare:

c. Coniina dă precipitate cu reactivii generali de precipitare ai alcaloizilor.

- Reziduul tratat cu 2 – 3 picături reactiv Mayer dă un precipitat alb (sensibilitatea 1 : 5000).
- Reziduul tratat cu 2-3 picături reactiv Drangendorff dă un precipitat galben (sensibilitatea 1 : 6000).
- Reziduul tratat cu 2-3 picături reactiv Bouchardat dă un precipitat brun.
- Reziduul de coniină dă reacţii de precipitare cu reactivul Hager decât în concentraţii mari.
- Reacţia cu sulfură de carbon: prin tratare cu sulfură de carbon se obţine sarea acidului coniincarbonic, ctistalizată în ace galbene, cu p.t. 71 - 72°C .
- Clorhidratul coniinei, obţinut prin evaporarea coniinei în soluţie de acid sulfuric foarte diluat, cristalizează în ace sau prisme alungite, dispuse în stea sau dentrite, cu caracter birefrigent.

2. Reacţii de culoare:

a. Coniina nu dezvoltă coloraţie cu majoritatea reactivilor generali de culoare.

b. Reacţia cu coloranil (tetraclorchinonă). în soluţie benzenică, coniina dă o coloraţie verde.

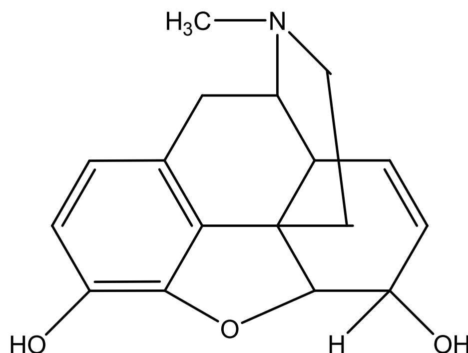
3. Test fiziologic:

Extractul eteric alcalin injectat la broască determină convulsii asemănătoare clor stricninice.

IV.1.9. DETERMINAREA PRINCIPALILOR ALCALOIZI NATURALI DIN OPIU

IV.1.9. MORFINA este principalul alcaloid din opiu având în structură nucleul fenantrenic. Morfina este o pulbere albă, puţin solubilă în cloroform, alcool amilic, eter acetic. Este absorbită de cărbune şi bentonită.

Sărurile sale: acetatul de morfină, clorhidratul de morfină, sulfatul de morfină, tartratul morfină sunt hidrosolubile şi precipitabile cu alcali.



A. Izolare:

a. Izolarea morfinei din urină:

Se alcalinizează 25 ml urină la pH = 8 cu amoniac 1/1 sau cu bicromat de sodiu şi se extrage de 2 ori cu câte 25 ml cloroform (diclormetan sau amestec cloroform : etanol (9 : 1). alcalinizarea se face în timpul agitării cu solventul, pentru ca morfina bază sa fie extrasă direct în formă amorfă de către solvent; în caz contrar forma amorfă trece în formă cristalină, greu solubilizată de solvent. De asemenea, nu se folosesc pentru alcalinizare, hidroxizi de sodiu sau de potasiu, deoarece se obţin fenolaţi (morfinaţi) hidrosolubili, deci, nextractibili cu solvenţi organici. Extractele organice reunite sunt filtrate pe sulfat de sodiu anhidru şi evaporate la sec la temperatură sub 80°C.

b. Izolarea metaboliţilor conjugaţi şi a morfinei din urină:

Se supun 25 ml urină la hidroliză acidă prin tratare cu 10 ml acid clorhidric 15% timp de 30 minute pe B.M. la fierbere, cu refrigerent ascendent. După răcire, se aduce la pH = 8 cu amoniac 10% sau bicarbonat de sodiu 10% şi se continuă cu extragerea cu cloroform ca în metoda precedentă.

B. Identificare:

1. Teste screening:

a. Reziduul se tratează cu 1 - -2 picături de acid azotic. În prezența morfinei se va dezvolta o colorație portocalie – roşiatică ce trece treptat în portocaliu – galben; heroină dă o colorație galbenă care se schimbă încet în verde-pal.

b. Reziduul se dizolvă într-un mililitru etanol. Se spotează o picătură reactiv pe o hârtie de filtru, peste care se adaugă o picătură reactiv Marque. Culoarea roşie care apare se schimbă în violet – albastru şi indică prezența în proba de analizat a morfinei, codeinei dau heroinei.

c. Reziduul se tratează cu picături Lafon (Merck9. În prezența morfinei se dezvoltă imediat o colorație albastră, care trece repede şi în verde şi în final în brun murdar; codina produce o colorație albastră – verzuie, ce virează în albastru deschis şi apoi în verde smarald, iar heroina dezvoltă o culoare verde, care virează în albastru şi apoi în final în verde oliv.

2. Reacții de precipitare:

a. Morfina congenerii săi dau reacții cu reactivii speciali ai alcaloizilor dând culori specifice conform tabelului nr.8

Alcaloid	Reactiv Fröde	Reactiv Marquis	Reactiv Lafon-Mecke	Reactiv Mandelin
Morfina	Violet	Violet	Verde	Albastru cenuşiu
Codeina	Verde	Violet	Verde intens	Verde
Dionina	Verde	Violet murdar	Verde smarald	-
Heroina	Violet	Violet	Verde cenuşiu	Albastru cenuşiu

b. Reacții datorate oxidului fenolic.

- Reziduul tratat cu clorură ferică 1% (proaspăt preparată) dă o culoare albastră sau verde albastră.

- Reziduul tratat cu 3- 4 picturi de fericianură de potasiu 10% şi 2 picături clorură ferică 1% (proaspăt preparată) dă o culoare albastră datorită reducerii fericianurii de potasiu la ferocianură de culoare oxidrilului fenolic, această clorură ferică dezvoltă o colorație albastră (albastru de Prusia sau de Berlin).

c. Reacția de diazotare (reacția Khrlich)

Se dizolvă reziduul în acid clorhidric 10% şi se tratează cu reactiv Khrlich (5 ml soluție A şi 3 picături soluție B). Se agită şi se alcalinizează cu bicarbonat de sodiu, când apare o colorație verde, care prin acidulare – trece în portocaliu. Reacția este negativă pentru derivații morfinei cu oxidrilul fenolic substituit.

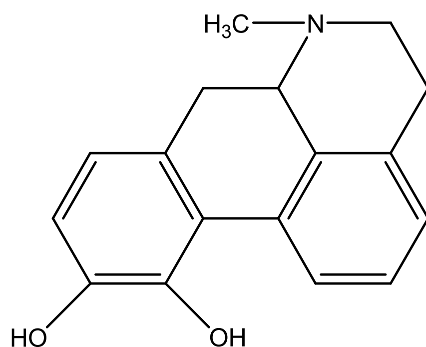
Reactiv Khrlich se prepară din:

Soluția A : 0,5 g acid sulfanilic se dizolvă în 5 ml acid clorhidric concentrat şi se aduce cu apă distilată la 100 ml.

Soluția B: nitrat de sodiu 0,5%

d. Reacția apormofinei:

Se încălzeşte reziduul pe B.M. cu 5 – 6 picături de acid sulfuric concentrat până la o uşoară brunificare. Are loc deshidratarea morfinei, cu formarea apormofinei (cu două funcții fenolice în orto).



Apomorfina se identifică:

- direct prin adăugare de 2 picături de acid azotic concentrat. Când apare o colorație roşie – orange (ce variază în galben); colorația este dată şi de brucină, dar culoarea nu se modifică la adăugarea unui exces de clorură sstanoasă;

- fie prin metoda Grimbert şi Leclere, adaptată de Denigés. La reziduul apomorfinic se adaugă, pentru tamponarea acidului sulfuric 5 ml soluție saturată de acetat de sodiu şi se încălzeşte pe B.M. 2 minute (dacă pH-ul nu este neutru, se mai adaugă acetat de sodiu crist.). se adaugă apoi 2 picături clorură mercurică 2% şi se mai lasă 4 – 5 minute pe B.M., apare o colorație verde, mai mult sau mai puțin intensă. Această reacție este caracteristică şi destul de sensibilă.

2. Reacția caracteristică a lui Denigés.

Această reacşie diferențiază morfina de cilalşi alcaloizi, din grupa sa. Reziduul se reia cu 1 ml acid clorhidric concentrat, se adaugă 2 picături apă oxigenată şi 2 picături amoniac (pH = 8-9) şi o picătură sulfat de cupru 0,5%. Reacția este pozitivă dacă se dezvoltă o colorație roz – roşie.

f. Reacția cu nitrit.

Reziduul se reia cu 2 ml acid clorhidric 10% şi se tratează cu 0,1 ml nitrit de sodiu 10%; se formează 2 nitrozo-morfina care prin alcalinizare cu amoniac dezvoltă o culoare roşie, colorimetrabilă.

4. Identificare prin CSS:

Alcaloizii din opiu se pot identifica prin CSS folosind.

- Suport : Silicagel G Merck – plăci cromatografice (5x10 cm sau 10x20 cm);
- Sisteme de solvenți: N-butanol-apă-amoniac (90 : 25 : 2 v/v/v);
- Soluție de analizat: extract coloroformic;

- Alcaloizi de referință. morfina, heroina, codeina;
- Revelare: - Reactiv Drangendorff;
- Iodoplatinat de potasiu;
- Reactuv Marcuis.

Valorile Rf-urilor şi culoarea spoturilor sun redate în tabelul alăturat:

Alcaloidul	Reactif Dragendorff	Rf
Morfina	Orange	0.36
Codeina	Cenuşiu	0.32
Heroina	Cenuşiu	0.40

5. <u>Determinarea cantitativă a morfinei</u>:
Principiu: Morfina formează cu nitritul de sodiu în mediu acid, 2-nitrozomorfina, de culoare galbenă în mediu acid şi roşie în mediul alcalin (amoniacal). Sensibilitatea reacției este de 5µg/ml.
Reactivi:
1. Soluție etalon morfină: 0,12 g morfină hidroclorică anhidră, corespunzând la 0,1 g morfină bază, se solvă în acid clorhidric 0,1 N şi după solvire se completează la 100 ml. soluția obțăinută conține 1 mg/ml.
2. Nitrit de sodiu 1% (proaspăt preparat);
3. Acid clorhidric 0,1 N.
4. Amoniac concentrat.
Tehnica de lucru: Reziduul obținut după extracție cu cloroform din mediul biologic, se dizolvă în 5 ml acid clorhidric 0,1 N şi se aduce cantitativ într-o eprubetă, se adaugă 2 ml nitrit de sodiu 1%, se agită şi se lasă 15 minute în repaus; apoi se adaugă 3 ml amoniac concentrat, iar după 5 minute se citeşte extincția la spectrofotometru Spekol în cuva de 1 cm la λ = 470 nm, față de martorul reactivilor.

Scară etalon:

Eprubeta						
Reactivi(ml)	1	2	3	4	5	6(M)
Sol.etalon(ml)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	-
Conc.µg	200	400	600	800	1000	-
HCl 0.1N	4.8	4.6	4.4	4.2	4.0	5.0
$NaNO_2$ 1%	2ml se agită,repaus 15minute					

NH_3 conc.	3 ml-după 5 minute se citește la
	Λ= 470nm

Calculul:

mg morfină/1000ml urină = ax1000 / n.p.1000

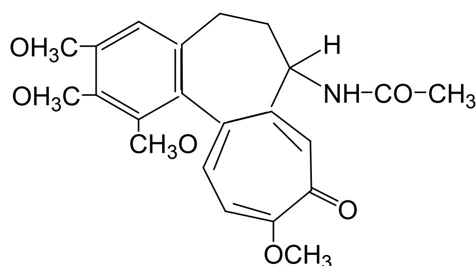
în care:

a = μg determinate în probă;

n = ml Hcl 0,1 N cu care s-a reluat reziduu;

p = ml probă biologică prelucrată.

Determinarea colchicinei



A. Izolare:

Colcichina se izolează prin metoda Stas-Otto-Origer, atât în mediu acid, cât şi în mediu alcalin.

Modul de lucru: 25 ml urină se alcalinizează la pH=10 cu hidroxid de sodiu 0,1 N şi se extrage cu 30 ml cloroform prin agitare timp de 5 minute. Extractul cloroformic se filtrază pe sulfat de sodiu anhidru, se împarte pe sticle de ceas, şi pe reziduu se execută reacții de indentificare.

B. Identificare:

1. Reacții de precipitare:

Dintre reactivii generali de precipitare ai alcaloizilor sunt mai sensibili reactivul Bouchardat şi reactivul Drangendorff. Cu reactivul Hager şi reactivul Mazer, colchicina precipită numai în soluții concentrate.

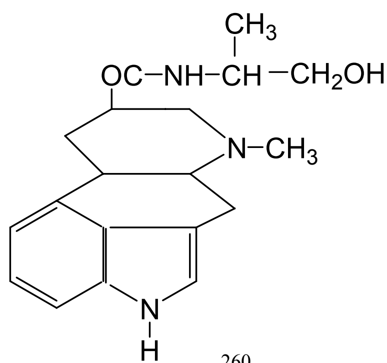
2. Reacții de culoare:

a. Dintre reactivii generali de culoare ai alcaloizilor, colchicina dă reacții cu:

- Acid azotic concentrat – colorație violetă care trece în roşu-portocaliu prin alcalinizare (reacția Geiger);
- Acid sulfuric concentrat – colorație galbenă; dacă se adaugă un cristal de azotat de potasiu se dezvoltă o colorație albastră, apoi verde, violetă, roşie şi galbenă. Uneori violetul apare concomitent cu verdele, astfel încât aspectul este al unui centru verde înconjurat de un lizereu violet. Dacă se alcalinizează cu hidroxid de potasiu 10%, apare o clorație roşie;
- Reactivul Lafon; albastru-verde, verde apoi brun;
- Reactivul Fröhde – galben;

- Reactivul Mandelin – galben deschis.
b. Reacția Pesez : prin tratarea soluției apoase de colchicinăcu izoniazidă 10% şi carbonat de sodiu 10%, apoi încălzit pe baia de apă a0 minute, se obține o colorație galben- portocalie.
c. Reziduul tratat cu 0,5 ml acid sulfuric concentrat şi câțiva cristali de acid tartric. În prezența colchicinei se obține o colorație verde.
d. Reziduul se dizolvă în 1 ml apă distilată. Se adaugă 2-3 picături apă de clor. se formează un precipitat galben - portocolaliu, solubil în amoniac cu apariția culorii roşii.
e. Reacția Vitali: reziduul este tratat cu câteva picături de acid azotic fumans şi evaporat pe baie de apă. Peste reziduu galben, se adaugă 3-4 picături hidroxid de potasiu soluție etanolică 1% (proaspăt preparată) când apare o colorație verde.
f. Reacția Ziesel (diferențierea colchcinei de ptomaine): prin încălzire cu acid clorhidric concentrat colchicima este demetilată, iar gruparea hidroxil liberă dă culoare verde cu clorură ferică 1% (proaspăt preparată). Potomainele nu dau o colorație în aceste condiții.
1. Cromatografie în strat subțire
Faza staționară: cromatoplăci cu silicagel G Merck.
Sistemul de developare: cloroform-acetonă-trietilamină (5 : 4 : 1 v/v/v).
Martori: colchicina în cloroform.
Proba de analizat: extract cloroformic (extracție de urină în mediul alcalin)
Revelare: a. În lumină Wud la λ = 254- 266 nm aparte un spot fluorescent de culoare galbenă.
b. cu reactivul Wasickz – apar spoturi de culoare galbenă.
În aceste condiții de lucru, colchicina are Rf = 0,52.
Dozarea spectrofotometrică. Principiu metodei
Colchicina reacționează cu reactivul Lieberman – Bouchardat dând colorație galbenă stabilă, colorimetrabilă la λ = 425 nm.
Reactivi:
- Reactivul Lieberman – Bouchardat: se amestecă 19 volume anhidridă acetică şi un volum acid sulfuric concentrat.
- 3 ml extract cloroformic de colchicină se tratează cu 3 ml reactiv Lieberman – Bouchardat, se obține o colorație galbenă care se spectrofotometrează la Spekol la λ 425 nm, față de proba martor)3 ml cloroform + 3 ml Liberman).

IV. 1.15. DETERMINAREA ALCALOIZILO DI ERGOT



A. Izolare:

1. Reacții de precipitare:

a. Reziduul reluat cu 1-2 picături de acid clorhidric 10% şi 4-5 picături acid trinitrobenzoic 5% formează cristale în formă de dendrite.

2. Reacții de culoare

- Ergometrina (Ergobazina)

a. Reactivul tratat cu 2-3 picături reactiv Marquis dă o colorație brună.

b. Rezidul tratat cu 2-3 picături reactiv Fröhde dă o clorație verde ce trece în roşu şi apoi în albastru.

c. Reacția Vitali executǎ pe reziduu dă o colorație portocalie-galben-purpurie.

- Ergotoxina

a. Reziduul tratat cu 2-3 picături reactiv Fröhde dă o colorație violet-albastră ce trece în verde.

b. Reziduul tratat cu 2-3 picături reactiv Mandelin dă o colorație violetce trece în verde.

c. Reziduul tratat cu 2-3 picături reactiv Lafon dă o colorație galbenă
ce trece în verde.

d. Reziduul tratat cu 2-3 picături reactiv Wasickidă o colorație violettrece în pal.

e. Reziduul tratat cu 2-3 picături reactiv Marquis dă o colorație neagră cu contur violet.

f. Reziduul tratat cu 2-3 picături acid sulfuric concentrat dă o dă o colorație galbenă ce trece în verde.

- Ergotamina

a. Reziduul tratat cu 2-3 picături reactiv Fröhde dă o colorație cenuşie-albastră .

b. Reziduul tratat cu 2-3 picături reactiv Mandelin dă o colorație brună.

c. Reziduul tratat cu 2-3 picături reactiv Marquis dă o colorație brună.

d. Reacția Vitali efectuată dă o colorație portrocalie violetă.

3. Cromatografie pe strat subțire

Reziduul reluat cu metanol se spotează pe cromatoplacă în paralel cu un martor.
sistemul de migrare: cloroform : metanol (9 : 1), amoniac concentrat : metanol (1,5 : 100)
Relevare: Se spotează placa cu reactiv paradimetilaminobenzaldehidă (PABA) (se dizolvă 1 g PABA în 100 ml etanol şi se adaugă 10 ml acid clorhidric concentrat). Se obține o fluorescență albastră în UV dată de prezența acidului lisergic.

4. Identificarea alcaloizilor globali

Se extrag alcaloizii globali din vomă, spălătură stomacală, corpuri delicte, cu eter etilic după alcalinizarea cu hidroxid de sodiu 10%. Extractul eteric se împarte în patru porțiuni şi se fac reacțiile de identificare:

- o cotă parte de extract se încălzeşte cu 1 ml hidroxid de potasiu 10% când se degajă un miros neplăcut de trimetilamină;
- o cotă parte de extract se tratează cu bicarbonat de sodiu 10% când apare o colorație roşie-violetă;

- o cotă parte de extract se tratează cu 5 ml acid sulfuric concentrat când apare o colorație portocalie, iar la limita de separație între cele două lichide apare un inel albastru.
- o cotă parte de extract se tratează cu 5 ml soluție oxalat de sodiu 5% când apare o colorație roşie.

5. Examen microscopic

Se execută examen microscopic pe conținut stomacal sau corpuri delicte, când se observă aglomerări de celule inegale, rotunjite sau alungite, iar fragmentele stratului periferic sunt colorate în brun-violaceu.

Cap. X. Problema alcoolilor

Toxicitatea alcoolilor monohidroxilici creşte cu numărul atomilor de carbon (regula lui Richardson), cu excepția metanolului care este deosebit de toxic. Alcoolii cu catenă normală sunt mai toxici decât izomerii ramificați, iar monoalcoolii sunt mai toxici decât polialcoolii, cu excepția etilenglicolului (Cotrău şi colab., 1993).

Cu creşterea numărului de atomi de carbon creşte liposolubilitatea şi, implicit, toxicitatea lor la nivelul SNC. Alcoolii $C_1 - C_3$ sunt solubili în apă şi slab narcotici.

Metaboliții lor au grade diferite de toxicitate, iar viteza mică de metabolizare asociată cu o eliminare lentă sporeşte toxicitatea în cazul metaboliților toxici.

Diferențele dintre gradele de toxicitate ale alcoolilor sunt nete: etilenglicolul este un toxic puternic, în timp ce glicerina este absorbită în doze înalte fără efecte nocive; metanolul este o otravă puternică, în timp ce etanolul este utilizat curent pentru a obține o stare euforică. Structura chimică poate explica numai parțial această comportare. Metaboliții pot explica în mare măsură toxicitatea alcoolilor. Mai greu se explică efectul lor direct asupra organismului, efectul euforic al etanolului, de pildă, imediat după introducerea în corp.

Gustul arzător al etanolului, precum şi gustul dulce al etilenglicolului şi al glicerinei pot fi conferite acestor substanțe de capacitatea moleculor lor de a vibra în rezonanță cu anumiți receptori moleculari aflați la nivelul papilelor gustative. Din păcate, cercetările în acest domeniu sunt încă în faza inițială. De asemenea, efectul vasodilatator periferic al alcoolului ar putea fi explicat prin perturbarea structurilor de apă inclusă în biostructură şi, implicit, prin perturbarea stării de excitație tripletică a moleculelor biologic active.

Alcoolul metilic, CH_3OH

Metanolul este un lichid volatil, inflamabil, cu miros şi gust asemănător etanolului, dar mai puternic şi mai iritant. Este miscibil cu apa şi majoritatea solvenților organici.

Toxicocinetică. Metanolul pătrunde pe cale digestivă, respiratorie şi, mai rar, transcutanată. Se distribuie, datorită hidrosolubilității, în toate țesuturile şi, în special, în lichidele oculare care conțin 99,7% apă. În ficat, sub acțiunea alcooldehidrogenazei (ADH) şi mai puțin a catalazei, se oxidează la formaldehidă, iar aceasta trece în acid formic, ambii metaboliți hidrosolubili; apar şi mici cantități de formiat de metil, liposolubil. Toți metaboliții sunt mai toxici decât metanolul. O oxidare la formaldehidă are loc şi în retină (în conuri şi bastonaşe) unde este prezentă ADH. Eliminarea are loc prin expirație (metanol) şi prin urină (metaboliți şi mici cantități de metanol).

Eliminarea metanolului din organism se produce în proporție de 25-75% sub formă nemodificată în aerul expirat, 3-10% în urină ca atare. Din total, 3% se regăseşte în urină sub formă de acid formic.

Metabolizarea şi eliminarea sunt lente, astfel încât metanolul se comportă ca un toxic cumulativ. Alcoolul etilic este utilizat drept antidot în intoxicația cu alcool metilic şi etilen glicol. Rolul de antidot al alcoolului etilic în intoxicația cu metanol se explică prin competiția pentru alcool dehidrogenază: etanolul se metabolizează de 4-5 ori mai rapid, încât metanolul rămâne nemetabolizat, şi devine astfel mai puțin toxic. Metanolul se comportă ca un toxic

cumulativ cu eliminare foarte lentă, ceea ce îl diferențiază de etanol. De asemenea, etanolul, având o tensiune superficială mai mare, deplasează metanolul de pe suprafața celulelor, favorizându-i eliminarea.

Toxicodinamie. Toxicitatea metanolului se datorează metaboliților săi care produc acidoză, anoxie celulară şi dereglări metabolice. Acidoza este provocată mai ales de acidul formic. Anoxia tisulară este consecința inhibării respirației celulare prin complexarea, de către acidul formic, a fierului din enzimele oxido-reducătoare. Retina este de asemenea afectată, deoarece este sensibilă la anoxie, iar pătrunderea metanolului la acest nivel şi metabolizarea locală conduce la metaboliți toxici în concentrație mare. Totodată, pătrunderea formiatului de metil liposolubil afectează şi nervul optic. Ca urmare, apar leziuni degenerative în celulele ganglionare ale retinei şi în nervul optic, precum şi tulburări circulatorii în coroide. Se mai înregistrează tulburări nervoase, hepatice, renale, pulmonare şi miocardice, multe dintre acestea datorându-se hipoxiei. Totodată, sunt dereglate unele procese biochimice datorită blocării grupărilor $-NH_2$ enzimatice de către HCHO. Doza letală este de 30 ml alcool metilic.

Simptomatologie. În *intoxicația acută* prin *ingerare* apar, după o perioadă de latență, tulburări digestive, respiratorii, neuropsihice (agitație, delir, convulsii), cardiovasculare, apoi comă şi moarte. Dacă victima supraviețuieşte, se instalează tulburările oculare (midriază, fotofobie, scăderea acuității vizuale, dureri în globii oculari), urmate brusc sau treptat de orbire temporară sau definitivă. Tulburările oculare apar ca urmare a acidozei, deoarece se accentuează odată cu aceasta. Intoxicația *acută* prin inhalare se manifestă prin iritația conjunctivelor şi mucoaselor respiratorii, tulburări nervoase şi oculare (orbirea definitivă este mai puțin frecventă). In aer, cocentrația maximă admisibilă este de 150 mg/m^3. În *intoxicația cronică* apar fenomene iritative, nervoase (cefalee, tremor), digestive, vizuale (reducerea câmpului vizual).

Primul ajutor. În intoxicația prin ingerare se practică spălătură gastrică cu soluție de $NaHCO_3$ 5%, purgativ salin şi tratament antidotic cu etanol, inițial 50 g, apoi câte 10 g pe oră. În intoxicația prin inhalare se recurge la oxigenoterapie şi/sau respirație artificială.

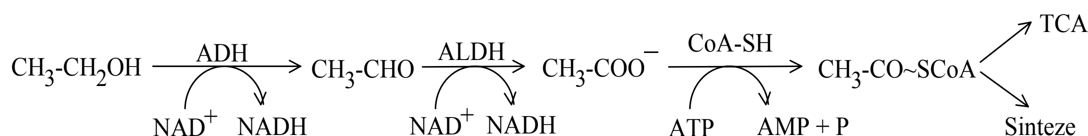
Toxicologie analitică. Metanolul se cercetează din aer (recoltare în apă distilată) şi medii biologice, corpuri delicte (distilare în mediu acid). Identificarea se realizează prin reducerea $K_2Cr_2O_7$ în H_2SO_4 concentrat (Cr^{3+}, verde) sau prin oxidarea CH_3OH la HCHO şi determinarea acesteia cu fenilhidrazină sau acid cromotropic în mediu de acid sulfuric. Se mai utilizează tuburi detectoare Dräger cu indicativul 100/a.

Etanolul, CH_3CH_2OH

Intoxicațiile se produc prin ingerare voluntară de băuturi alcoolice şi acestea sunt acute şi cronice (alcoolism). Etanolul este un lichid incolor, d = 0,788, volatil (p.f. 78,3 ^oC), cu gust arzător, miros specific, miscibil cu apa.

Toxicocinetică. Etanolul este imediat absorbit şi distribuit în toate țesuturile, fără acumulare. Se elimină prin expirație (3-7%) şi urină (2-4%), restul este metabolizat în ficat, succesiv la acetaldehidă, acid acetic şi bioxid de carbon. Oxidarea la acetaldehidă se realizează, la cantități mici de alcool, sub acțiunea alcooldehidrogenazei (ADH); la cantități mai mari de etanol, intervin sistemul microzomial de oxidare (MEOS și oxidaze cu funcții

mixte microzomiale) şi catalaza (CAT sau peroxidaze). Datorită conținutului constant de ADH din ficat, oxidarea etanolului are loc cu o viteză aproape constantă de 8 g etanol/oră.

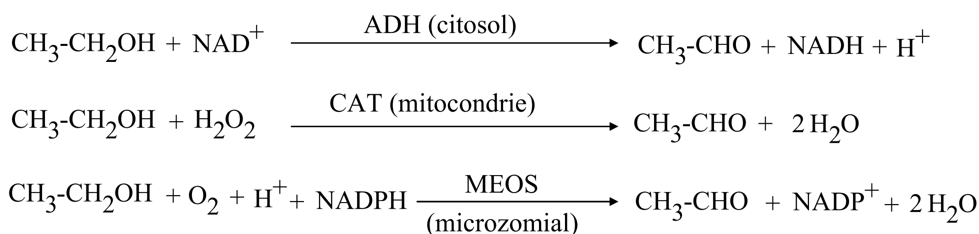


Biotransformarea etanolului

ADH = alcooldehidrogenaza; ALDH = aldehiddehidrogenaza; CoA-SH = coenzima A; NAD^+, NADH = nicotin-amidadenindinucleotid oxidat si redus; AMP = adenozinmonofosfat; ATP = adenozintrifosfat; P = fosfat anorganic; TCA = ciclul acizilor tricarboxilici (ciclul Krebs)

Toxicodinamie. Etanolul are un efect deprimant asupra SNC. Această acțiune începe cu scoarța cerebrală şi se continuă până la bulb. Inhibarea centrilor superiori, cu funcții de coordonare şi control, antrenează şi relaxarea centrilor inferiori, fapt ce explică efectul aparent stimulator al băuturilor alcoolice.

Etanolul acționează toxic prin molecula netransformată, prin acetaldehidă şi prin creşterea raportului $NADH/NAD^+$.



Oxidarea etanolului la acetaldehidã

Acetaldehida este în majoritate transformată în acetat. Cantități infime reacționează cu catecolaminele şi cataboliții lor formând compuşi tetrahidropapaverolinici cu grupările ─SH din glutationul redus şi coenzima A, scăzându-le activitatea, şi cu $─NH_2$ din proteine şi enzime, degradându-le structural şi funcțional.

Oxidarea etanolului şi a acetaldehidei sub acțiunea ADH, respectiv ALDH, necesită prezența NAD^+, care trece în NADH. În cazul metabolizării unor mici cantități de alcool etilic, reoxidarea NADH în citoplasmă are loc pe seama compuşilor în formă "oxidată", acidul piruvic şi fosfodihidroxiacetona. Deoarece aceşti compuşi sunt în cantități limitate, reoxidarea NADH în prezența unor mai mari cantități de alcool nu se mai face total în citoplasmă, ci se completează și în mitocondrii. Membrana mitocondrială este însă impermeabilă pentru NADH şi, de aceea, celula utilizează sistemul malat-aspartat care realizează transferul H^+ de la NADH citoplasmatic la NAD^+ intramitocondrial. Reacțiile înlănțuite prezentate în această figură asigură oxidarea etanolului fără acumulare de NADH numai atât timp cât nu este depăşită capacitatea de oxidare a lanțului respirator. Pentru cantități mai mari de etanol însă, NADH se acumulează în citoplasmă şi mitocondrii, cu creşterea valorii raportului

$NADH/NAD^+$. Această creştere conduce la perturbarea ciclului Krebs, a metabolismului glucidic şi lipidic, constituind "toxicitatea biochimică" determinată de consumul excesiv de alcool, având drept consecință acumularea de acetat (care nu mai poate fi oxidat în ciclul Krebs), hiperlactacidemie şi hipoglicemie (prin perturbarea glicolizei şi neoglicogenezei, acumularea lipidelor în hepatocit (cu apariția steatozei).

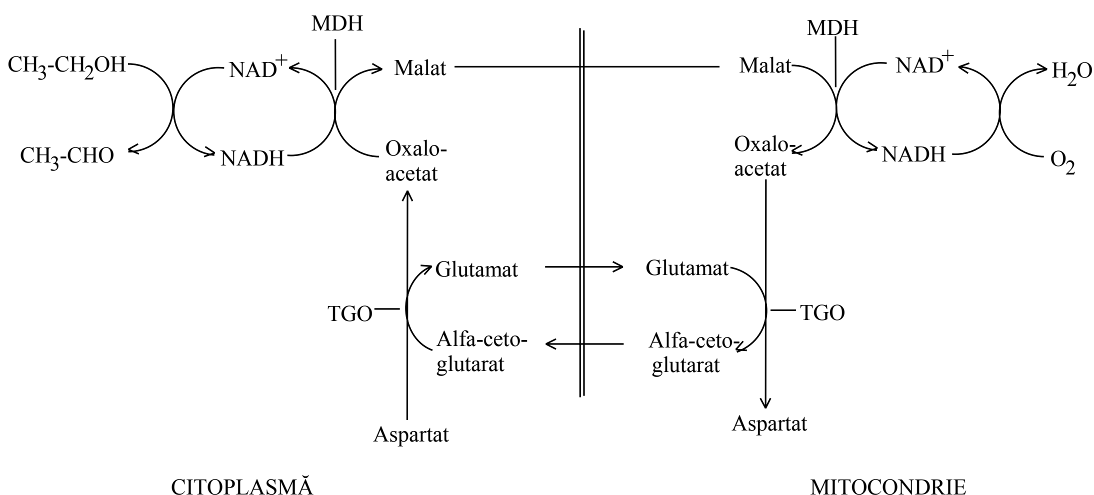
Deoarece alcool dehidrogenaza (ADH) catalizează transformarea retinolului în retinal, blocarea sa în procesul de oxidare a etanolului conduce la un deficit de retinal. Retinalul este însă indispensabil procesului vederii şi spermatogenezei, ceea ce explică amauroza etilică şi perturbarea spermatogenezei din intoxicația etilică. Doza letală este de 4-6 g etanol pur/kg corp.

Simptomatologie. În *intoxicația acută* se remarcă trei faze: faza de "excitație" la o alcoolemie de 0,5-1,5 g $^o/_{oo}$ cu euforie, logoree, expansivitate, senzație de căldură (vasodilatație periferică), diminuarea capacităților fizice şi psihice; faza medico-legală (faza de "beție, alcoolemie 1,5-2,5 $^o/_{oo}$), cu mers ebrios, disartrie, confuzie mintală, scăderea acuității auditive şi vizuale, tulburări psihice ducând la acte agresive; faza comatoasă (peste 2,5 $^o/_{oo}$) cu midriază, hipotermie (prin vasodilatație generalizată), comă, uneori cu sfârşit letal. Alcoolemii peste 4 g $^o/_{oo}$ (300-400 ml alcool pur) conduc rapid la comă şi moarte.

În *intoxicația cronică* se observă manifestări neuropsihice (polinevrită, nevrită optică retrobulbară, tulburări de comportament, insomnie, *delirium tremens*) şi manifestări organo-somatice (gastrite, ulcere, hepatită subacută până la ciroză, tulburări cardiovasculare, endocrine, etc.). Alcoolismul reprezintă o "toxicomanie, denumită "incapacitate legată de alcool".

Primul ajutor. În primele două ore de la ingerare, se recurge la spălătură gastrică cu soluție de $NaHCO_3$ 5%. Intoxicații comatoşi sunt spitalizați.

Toxicologie analitică. Etanolul se cercetează din aer, medii biologice şi corpuri delicte (distilare în mediu acid). Identificarea se realizează prin reacția xantogenatului sau reducerea $K_2Cr_2O_7$, iar dozarea, enzimatic (cu ADH, gaz-cromatografic, colorimetric sau volumetric (prin dozarea excesului de $K_2Cr_2O_7$ rămas după oxidarea etanolului în mediu acid).

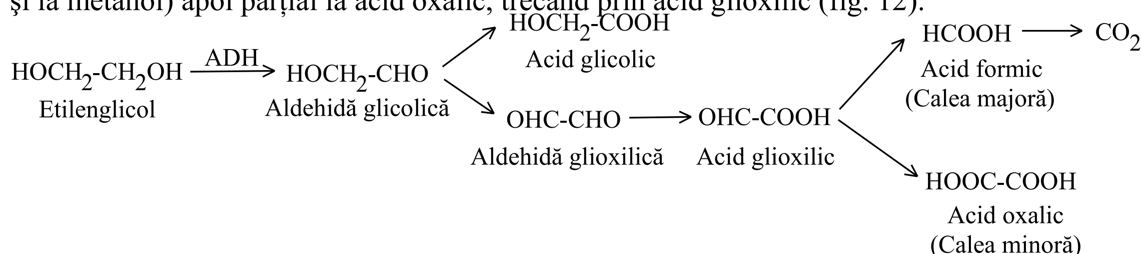


Oxidarea NADH la NAD^+ prin intermediul sistemului malat-aspartat (după Nordmann)

ETILENGLICOLUL, $HO-CH_2-CH_2-OH$

Lichid incolor, vâscos, cu gust dulceag. Este relativ şi miscibil cu apa, alcoolul etilic, acetona, acidul acetic, glicerina şi piridina. Este insolubil în eter etilic, CS_2, hidrocarburi halogenate, uleiuri şi hidrocarburi aromatice. Este utilizat ca solvent şi lichid antigel. Concentrația maximă admisibilă este de 274 mg/m^3 aer.

Toxicocinetică. Pătrunderea etilenglicolului în organism se face pe cale digestivă şi numai accidental respiratorie. Se distribuie în toate țesuturile. Se elimină 40 % nemodificat pe cale renală, iar 60% se biotransformă oxidativ, inițial la aldehidă glicolică sub acțiunea alcooldehidrogenazei (ADH) cu viteză mică (ceea ce explică efectul antidotic al etanolului, ca şi la metanol) apoi parțial la acid oxalic, trecând prin acid glioxilic (fig. 12).



Biotransformarea etilenglicolului

Acidul oxalic formează cu calciul oxalat de calciu care obturează tubii renali şi afectează miocardul şi alte organe.

Toxicodinamie. Toxicitatea etilenglicolului se datorează metaboliților săi, care sunt mai toxici, şi anume acidul glioxilic şi acidul oxalic. Etilenglicolul conduce la edem cerebral. Doza letală la adult este 100 g.

Leziunea principală este necroza tubulară acută, iar pe plan metabolic, acidoza metabolică. Intoxicația acută determinată de ingerarea etilenglicolului debutează prin tulburări digestive, apoi neuropsihice (de la euforie până la comă convulsivă), acidoză, manifestări cardiovasculare (tulburări de ritm, insuficiență acută cardiovasculară) şi insuficiență renală acută, adesea fatală.

Intoxicația cronică apărută în cazul inhalărilor repetate de vapori de etilenglicol se manifestă prin tulburări ale sistemului nervos cu pierderea temporară a cunoştinței, inapetență, somnolență, grețuri, dureri de cap. În unele cazuri se observă modificări ale formulei hematologice, rinite şi conjuctivite, modificări ale funcțiilor hepatice şi ale splinei şi anomalii în depunerea fierului în organism.

Primul ajutor.

— se limitează la maxim efortul fizic al accidentatului;

— se administrează apă şi se provoacă vărsături;

— se aplică spălătură gastrică cu suspensie de cărbune activat sau soluție de $KMnO_4$:

— administrarea de purgative saline;

— se recomandă aport de lichide;

— se administrează, ca antidot, alcool etilic 50% per os, 0,75 ml/kg corp;

— oxigenoterapie sau respirație artificială;

— se anunță de urgență medicul.

Analiza toxicologică:

— folosind metode gaz-cromatografice, spectrofotometrie în UV şi vizibil;

— prin oxidare cu acid periodic la formaldehidă şi determinarea acesteia cu fenilhidrazină sau acid cromotropic.

Determinarea cantitativă a alcoolilor

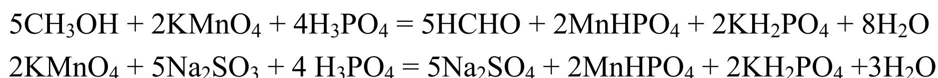
a. Izolare

Alcooli se izolează di aer prin reținere în soluții adecvate din aer, iar din produse biologice şi alte produse – prin distilare, antrenare cu aer cald sau microdifuzie în celule Conway sau celule Menzicescu.

1.1. ALCOOLUL METILIC

B. Identificare

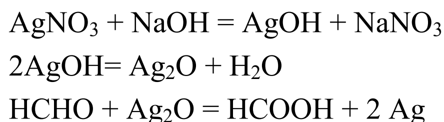
1. Reacția Kolthoff – Denigès: la 2 ml soluție de analizat se adaugă 1 ml acid fosforic 25% şi 0,5 ml $KMnO_4$ 2%. După 10 minute se distruge excesul de $KMnO_4$ cu perhidrol 12% (v/v) sau sulfit de sau sulfit de sodiu 15% adăugat cu picătura până la decolorarea soluției, evitând excesul de perhidrol sau sulfit. În lichid se identifică formaldehida (v. formaldehida).



$$5CH_3OH + 2KMnO_4 + 4H_3PO_4 = 5HCHO + 2MnHPO_4 + 2KH_2PO_4 + 8H_2O$$

$$2KMnO_4 + 5Na_2SO_3 + 4\ H_3PO_4 = 5Na_2SO_4 + 2MnHPO_4 + 2KH_2PO_4 + 3H_2O$$

În cazulprezenței concomitente a formaldehidei, aceasta se îndepărteazăastfel: se tratează 10 ml soluție de analizat cu 5 ml $AgNO_4$ 10% şi 5 ml NaOH 30%. Se încălzeşte cu refrigerent ascendent timp de 30 minute şi se distilă. Formaldehida se oxidează la acid formic, care nu distilă. Formaldehida se oxidează la acid formic, care nu distilă şi concomitent, Ag_2O se reduce la Ag metalic (oglindă de argint):



$$AgNO_3 + NaOH = AgOH + NaNO_3$$

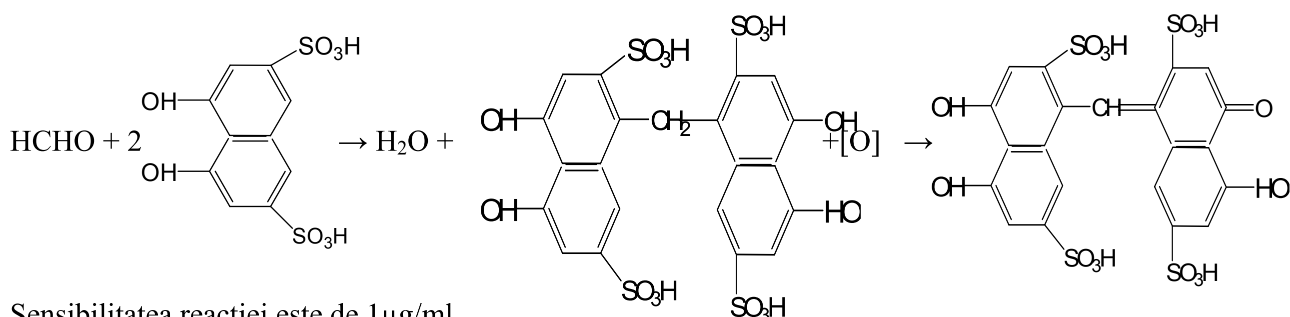
$$2AgOH = Ag_2O + H_2O$$

$$HCHO + Ag_2O = HCOOH + 2\ Ag$$

În cazul indentificării metanolului în sânge se produce astfel: se tratează 2 ml sânge cu 2 ml acid triclor acetic 20%, se centrifughează şi peste 1 ml supernatant se adaugă 0,2 ml $KMnO_4$ 1% şi 0,1 ml acid fosforic 85%. Se agită 1 minut, se reduce excesul de $KMnO_4$ cu câteeva cristale de bisulfit de sodiu. Se adaugă 1 ml acid cromotropic 1% în acid sulfuric concentrat şi apoi cu grijă, 1 ml acid sulfuric concentrat. La zona de contact a fazelor se observă un inel violet, iar la agitare, colorația difuzează. În absența metanolului, apare o colorație brun – deschis.

2. Reacții de esterificare:

a. Se încălzeşte 1 ml soluție de analizat cu 0,1 g acid salicilic şi 1 ml acid sulfuric concentrat : se dezvoltă un miros specific de salicilat de metil, $C_6H_4(OH)COOCH_3$;
b. Se adaugă la 2ml soluție de analizat, 2-3 picături de clorură de bemzil (sau câteva cristale de acid benzoic) şi 0,5 ml H_2SO_4 conc. Se neutralizează cu NaOH 20% când se dezvoltă un miros specific de benzoat de metil, $C_6H_5COOCH_3$.
C. Dozare: Metoda spectrofotometrică cu acid cromotropic pentru metanol
Principiu
Metanol este oxidat la formaldehidă. Aceasta este tratată cu acid cromotropic (acid 1,8-dihidroxinaftalen, 3,6- disulfonic) în mediu acid, când se obține un compus violet, colorimetrabil:

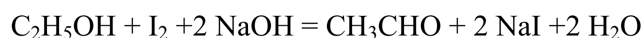
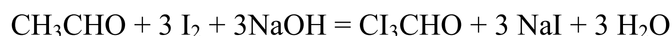
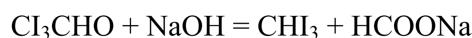


Sensibilitatea reacției este de 1µg/ml.
Reactivi
1. Soluție absorbantă: apă distilată;
2. Permanganat de potasiu, soluție 2%;
3. Acid fosforic 50%
4. Sulfit de sodiu, soluție saturată;
5. acid cromotropic, soluție 5% proaspăt preparată.
În momentul întrebuințării, se diluiază 5 ml la 100 ml acid sulfuric 15N.
6. Acid sulfuric 9M.
7. Soluție etalon de metanol: se cântăreşte un balon cotat de 50 ml conținând cca. 15 ml apă, se introduc 4-5 picături metanol pur si se recântăreşte, diferența reprezintă cantitatea de metanol. Se aduce la semn cu apă. Se prepară soluția etalon, astfel ca soluția să conțină 1 ml = 0,1 mg = 100 µg.
Recoltarea probelor
Se apiră minimum 1litru aer, cu un debit de 0,2 litri/minut printr-un microabsorbitor conținând 2 ml apă distilată.
În afară de microabsorbitoarele destinate recoltării de probe, se prevăd încă două, cu câte 2 ml apă distilată, care se transportă în teren fără a aspirara aer prin ele, constituind probele martor.
Modul de lucru
Se transvazează cantitativ conținutul microabsorbitorului într-o eprubetă gradată de 10 ml. Se adaugă 1 ml permanganat de potasiu şi 0,5 ml acid fosforic. Se lasă împreună 15 minute, se decolorează excesul de permanganat cu sufit, evitând excesul, apoi se adaugă 5 ml acidcromotropic, agitând şi răcind la robinet. Se aduce proba în baia de apă la fierbere, menținând-o 30 minute. Se răceşte şi se completează la 10 ml cu acid sulfuric 9 M.

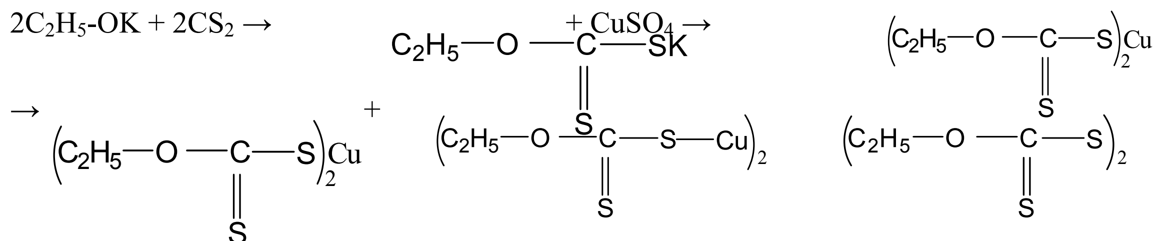
În paralel se prelucrează şi probele martor.
Se măsoară extincția probelor la spectrofotometru la λ = 580 nm, ăn cuva de 1 cm, față de martor.
Curba de etalonare se întocmeşte între 20 şi 100 µg, prin puncte din 20 în 20, în codițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, obținându-se concentrația C a metanolului, în µg, în probă.

Reactivi(ml)	Eprubeta					
	1	2	3	4	5	6
Standard de lucru(100 µg / ml)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	-
$KMnO_4$ 20%	20	40	60	80	100	-
H_3PO_4 5 %	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	2.0
Na_2SO_3 sol. saturată	1.0 se agită					
Acid cromotroforic	5.0 se mentin eprubetele 30' în BM în fierbere, se răcesc imediat					
H_2SO_4 9 M	până la 10 ml					

Calcul
Rezulatele exprimate în mg metanol/m^3 aer:
mg, metanol /m^3 aer = C/V
în care:
C = concentrația metanolului în µg;
V = volumul de aer recoltat, în litri.
Normele republicane în vigoare prevăd pentru alcoolul metilic CMA = 100mg/m^3 aer.

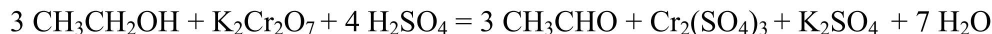
ALCOOLUL ETILIC
B. Identificare
1. Reacția Leben: se alcalinizează 2 ml soluție de analizat cu NaOH 1% sau Na_2CO_3 10%, se încălzeşte uşor şi se adaugă soluții Lugol (4 g iod şi 4 g KI la 100 ml apă) până la apariția culorii galbene-portocalie. Se distruge excesul de iod cu NaOH 10% sau Na_2CO_3 10% când apare opalescență şi miros de iodoform, caracteristic, sau chiar precipitat galben cu forme caracteristice la microscop (la concentrații mai mari de etanol):

$C_2H_5OH + I_2 + 2\,NaOH = CH_3CHO + 2\,NaI + 2\,H_2O$

$CH_3CHO + 3\,I_2 + 3NaOH = CI_3CHO + 3\,NaI + 3\,H_2O$

$CI_3CHO + NaOH = CHI_3 + HCOONa$
Reacția este sensibilă, dar nespecifică, fiind dată de acetonă şi metiletilcetonă, precum şi de acetaldehidă. Diferențierea cetonelor de etanol şi acetaldehidă se realizează, dacă soluția de analizat este alcalinizaztă cu amoniac în loc de NaOH, după care se adaugă soluție Lugol. În prezența etanolului şi acetaldehidei apare un precipitat cenuşiu-negru de iodură de azot, pe când acetona, în aceleaşi condiții, dezvoltă miros de iodoform.

2.<u>Reacția xantogenaților</u>: la 2 ml soluție de analizat se adaugă o granulă de KOH de agită şi se încălzeşte uşor, se acidulează slab cu acid acetic !%, se adaugă câteva picături de sulfură de carbon şi 2-5 picturi sulfat de cupru 5%. Se formează inițial un precipitat negru de xantogenat cupric, care trece prin dismutație în xantogenat cupros, galben.



3. <u>Reducerea bicromatului</u>: se tratează 2 ml soluție de analizat cu câteva picături $K_2Cr_2O_7$ 5% şi 1 ml H_2SO_4 conc., când se dezvoltă o culoare verde (Cr^{3+}), iar etanolul se oxidează, în funcție de condițiile de reacție, la acetaldehidă sau acid acetic:

- la rece:



$3\ CH_3CH_2OH + K_2Cr_2O_7 + 4\ H_2SO_4 = 3\ CH_3CHO + Cr_2(SO_4)_3 + K_2SO_4 + 7\ H_2O$

- la cald:



$3\ CH_3CH_2OH + 2\ K_2Cr_2O_7 + 8\ H_2SO_4 = 3\ CH_3COOH + 2\ Cr_2(SO_4)_3 + 2\ K_2SO_4 + 11\ H_2O$

Reacția este specifică, fiind dată de toți alcoolii, ca alte substanțe organice şi substanțe reducătoare.

C. <u>Dozare din aeru expirat, sânge, urină, organe.</u>

1. <u>Metoda rapidă pentru etanol, din aerul expirat</u>.

Se folosesc, fie tuburi umplute cu silicagel impregnat cu bicromat de potasiu sau anhidridă cromică şi acid sulfuric- când se modifică culoarea de la galben (Cr^{6+}) la verde (Cr^{3+}), concomitent cu oxidarea etanolului la acetaldehidă - fie aparte speciale, de tipul Acootest, Breathanalyser etc., bazate pe reacții chimice sau măsurători fizice (de exemplu, absorbție în I.R.).

2. <u>Metoda iodometrică (oficială) pentru etanol din produse biologice (metoda Cordebard)</u>

<u>Principiu</u>

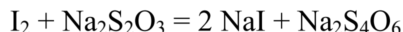
Etanolul, izolat din produsul biologic prin distilare, este oxidat, la rece, până la acid acetic, cu bicromat de potasiu, în mediu de acid acetic. Excesul de bicromat este titrat iodometric, în prezența amidonului sau a alcoolului polivinilic ca indicator:



$3C_2H_5OH + 2K_2Cr_2O_7 + 16HNO_3 = 3CH_3COOH + 4KNO_3 + Cr(NO_3)_3 + 11H_2O$



$K_2Cr_2O_7 + 6\ KI + 14\ HNO_3 = 2\ Cr(NO_3)_3 + 8\ HNO_3 + 2\ I_2 + 7\ H_2O$



$I_2 + Na_2S_2O_3 = 2\ NaI + Na_2S_4O_6$

<u>Reactivi</u>

1. acid picric, soluție saturată. De aduc într-o capsulă 20 g acid picric, se adaugă 1000 ml apă şi se încălzeşte amestecul la uşoară fierbere, timp de 10-15 minute, apoi se răceşte şi se filtrează.
2. Acid succinic sau acid tartric, soluție 5%;
2. Acid azotic d = 1,42 8lipsit de substanțe reducătoare).
3. Iodură de potasiu, soluție 2% proaspăt preparată. Se păstrează în sticle brune cu dop rodat.
5. Bicromat de potasiu, soluție N/6,9 (0,144 N). Se cântăresc exact 7,1065 g bicromat de potasiu pulverizat, în prealabil uscat la 125-150°C şi se dizolvă în 1000 ml apă distilată. Soluția se conservă la întuneric. Din această soluție, 3 ml corespund 10 ml bicarbonat de potasiu N/23 (0,0435 N) şi oxidează 5 mg etanol.
6. Tiosulfat de sodiu, soluție N/23 (0,0435 N). Se dizolvă în 11 g $Na_2S_2O_3$. H_2O în apă distilată proaspăt fiartă şi răcită, într-un balon cotat de 1000 ml, se adaugă 0,10 g carbonat de sodiu anhidru şi se completează la semn cu apă. După câteva zile se determină titrul, care se verifică apoi săptămânal. Stabilitatea titrului se face astfel se iau 3 ml bicromat N/6,9, exact măsurați, se adaugă 5 ml apă distilată, 4 ml HNO_3 şi 20 ml KI 2%. Se astupă flaconul şi după 2-3 minute, se titrează iodul pus în libertate cu tiosulfat N/23 (indicator amidon sau alcool polivinilic). Factorul se calculează după formula:

$F_{tiosulfat} = 10 / n$

în care:
10 = ml bicromat N/23, corespunzând la 3 ml bicromat N/6,9 :
n = ml tiosulfat N/23, folosiți în titrare.
7. Indicator amidon 15 sau alcool polivinilic 10% (se dizolva 10 g alcool polivinilic, lipsit de substanțe reducătoare, în 100 mlapă fierbinte; se continuă încălzirea, agitând, până la dizolvarea completă, (soluția se păstrează în flacoane bine închise, la rece).

Modul de lucru

a. Izolare

Sânge: se aduc 5 ml sânge recoltat pe anticoagulante, exact măsurați, într-un balon de distilare de 300ml, se adaugă 20 ml apă, 25 ml acid picric (sau 45 ml acid succinic) şi puțină piatră ponce. Se agită uşor şi se adaptează la coloană de distilare Vigreux, care se continuă cu un refrigerent descendent, prevăzut cu o alonjă. Capătul alonjei se introduce într-un balon cotat de 25 ml, în care se găsesc 2-3 ml apă distilată. Se distilă până aproape de semnul balonului, apoi se completează cu apă la semn. Distilarea durează aproximativ 25 minute.

Urină: se aduc 5 ml urină exact măsurați într-un într-un balon de distilare de 300 ml şi se continuă ca la sânge.

Organe: se cântăreşte repede o cantitate de organe (în funcție de natura organului) se mojarează cu nisip purificat şi se trece în balonul de distilare, reluând de câteva ori cu apă, se adaugă acid picric şi se continuă cala sânge.

b. Dozare (metoda Cordebard modificată de Banciu şi Droc):

Într-un Erlenmeyer de 100 ml cu dop rodat, se iau 5 ml distilat(în cazul sângelui şi al urinei, corespunde la 1 ml produs), se adaugă 3 ml bicromat N/6,9 (măsurați cu microbiureta) şi 4

ml HNO_3 conc. Se acoperă balonul, se lasă în repaus 15 minute exact, se adaugă 20 mlKI 2%. După 2 minute se titrează iodul pus în libertate de excesul de bicromat, cu tiosulfat N/23, în prezența soluției de amidon sau de alcool polivinilic (ultimul virează la roşu la incolor).

Calcul

1 ml bicromat N/23 = 0,0005 g etanol

g etanol/1000 ml sânge (urină) = (10 – n) x 0.5 = 10 – n / 2

în care:

10 = ml ml bicromat N/23 (la care corespund 3 ml bicromat N/6,9 şi care oxidează 5 mg etanol);

N = ml tiosulfat N/23 folosiți la filtrare.

Observații

1. Dacă distilatul conține mai mult etanol decât ar putea oxida bicromatul, se ia in lucru un alicot ??? mai mic.
2. Reactivii utilizați trebuie să fie p.a sau chimic pur – să nu conțină substanțe reducătoare.
3. În cazul sângelui, rezultatele sunt corecte numai dacă sângele nu a fost purificat. În cazul sângelui coagulat, se lucrează pe ser şi rezultatul final se împarte cu 1,2 ; deoarece etanolul este repartizat în cantitate mai mică în ser decât în sângele total.
4. În condițiile metodei, metanolul, aflat eventual în produsul biologic, este oxidat la rece numai în proporție de aproximativ 15%. Depistarea metanolului în sânge se face după tehnica indicată la metanol (v. Metanolul).
5. Se recomandă ca dozarea să se execute pe două probe paralele.
6. Din cauza scăderii, în timp, a concentrației de etanol, se recomandă să se adauge 0,15% la rezultatul analizei, pentru fiecare oră de întârziere. această corecție se face, neținând seama de primele două ore şi pe o perioadă care să nu depăşească 5-6 ore (adică 7-8 ore) de la recoltrea sângelui. Peste această limită, siguranța calcului este mai redusă.

ETILENGLICOLUL:

B. Identificare:

1. Oxidarea la acid oxalic. se tratează 2 ml soluție de analizat cu0,5 ml HNO_3 conc. şi se încălzeşte uşor; se formează acid oxalic, care decolotează soluția sulfurică de $KMnO_4$.

2. Reacția Malaprade: la 2 ml soluție de analizat se adaugă 0,5 ml acid periodic 5%; după 20 minute se distruge excesul de acid percloric cu metaarsenit de potasiu 3% şi se identifică HCHO formată.

DETERMINAREA ALDEHIDELOR ŞI CETONELOR

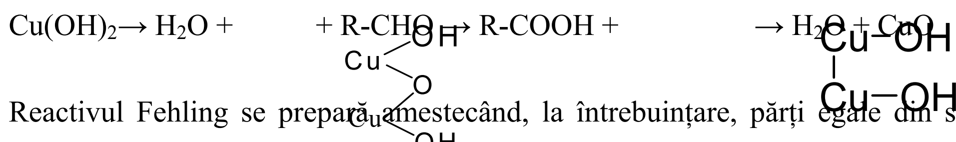
A. Izolare

Aldehidele se izolează din aer prin reținere în soluții absorbante adecvate, iar în produse biologice, prin distilare şi antrenare cu vapori de apă.

B. Identificare

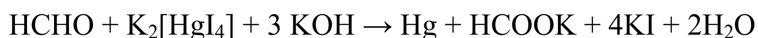
3.1. Reacții comune aldehidelor

a. <u>Reacția Fehling</u>: peste 2 ml soluție de analizat se adaugă 2ml reactiv Fheling şi se aduce la fierbere, când apare un precipitat roşu - cărămiziu de Cu_2O:

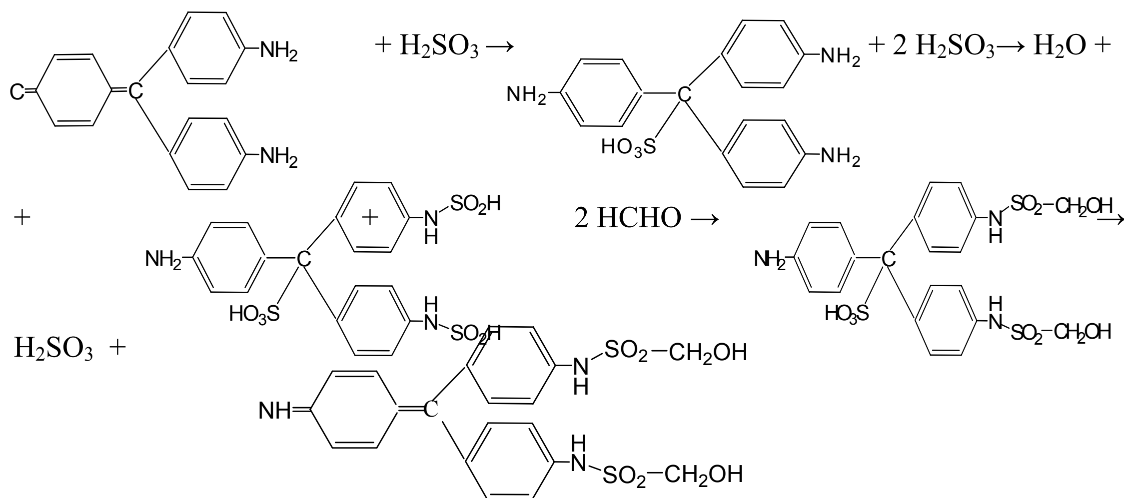


Reactivul Fehling se prepară amestecând, la întrebuințare, părți egale din soluția A şi B. Soluția A: se dizolvă 35 g $CuSO_4$. 5 H_2O în apă, se adaugă 5 ml H_2SO_4 conc. şi se completează cu apă la 1000 ml. Soluția B: se dizolvă 150 g sare Seignette (tartrat de K şi Na) în apă, se adaugă 300 ml NaOH 30% şi se completează cu apă la 1000 ml.

b. <u>Reactiv Nessler</u>: peste 2 ml soluție de analizat se adaugă 2-3 picături reactiv Nessler, când apare un precipitat negru, prin punerea în libertate a mercurului metalic:



b. <u>Reacția Schiff</u>: peste 1 ml soluție de analizat se adaugă câteva picături reactiv Schiff, când apare o colorație roşie – violetă, datorită unui derivat trifenilmetanic:

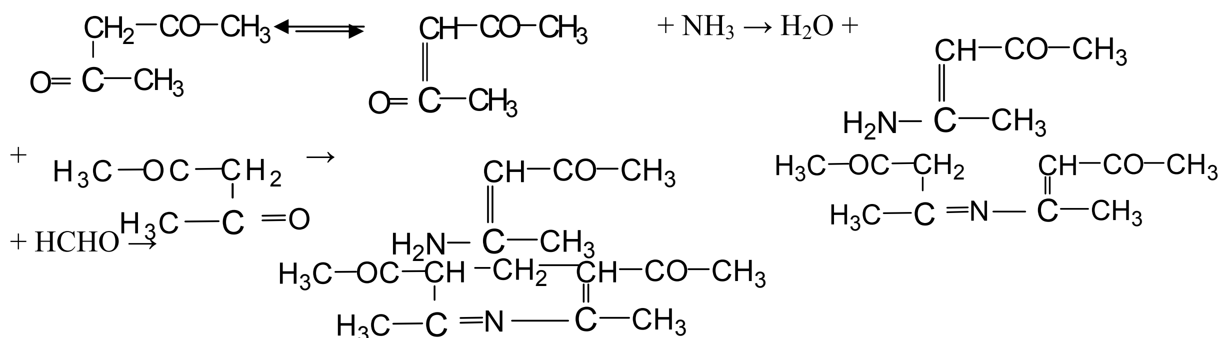


Reactivul Schiff se prepară astfel: se dizolvă 0,2 g fuxină bazică (pararozanilină) în 120 ml apă fierbinte, se răceşte, se adaugă 20 ml soluție bisulfit de sodiu 10% (bisulfitul nu trebuie să fie oxidat) şi 2 ml HCl conc. , apoi se completează la 200ml cu apă distilată. Se întrebuințează după minimum 2 ore. Reactivul trebuie să fie incolor, el se colorează sub acțiunea oxidanților sau prin încălzire.

Sensibilitatea reacției este de 0,2 μg/ml. Reacția poate reveni la diferențierea formaldehidei de alte aldehide, deoarece prin adăugare de HCl, colorația dată de alte aldehide dispare, pe când cea datorită formaldehidei se intensifică spre albastru-violet.

d. <u>Reacția Marcuis</u> se tratează 5 părți soluție de analizat cuo parte H_2SO_4 conc. şi se răceşte. La 3-5 picături din această soluție se adaugă 2-3 cristale codeină sau morfină dizolvate în 2 ml H_2SO_4 conc., când apare o colorație violet – roşie până la violet – albastră.

e. Reacția Egrive (cu acid cromotropic): se tratează 1 ml soluție de analizat cu 1 ml reactiv cromotropic, când apare o colorație violetă.
Reactivul acid cromotropic: se dizolvă 0,2 g acid cromotropic în 2 ml apă şi se aduce la 100 ml acid sulfuric concentrat.
f. Recția Scheyver (cu fenilhidrazină): se adaugă, la 1ml soluție de analizat, 1 ml soluție fenilhidrazină clorhidrică 1%, proaspăt preparată, 1 ml acid clorhidric d= 1,19 şi 1 ml fericianură de potasiu 1%, când apare o colorație roşie.
3.2. FORMALDEHIDA (reacții sprcifice)
a. Reacția cu acetilacetonă: se adaugă, la 1 ml soluție de analizat, 2 ml reactiv acetiacetonă şi se menține 5 minute în baia de apă la fierbere, când se dezvoltă o colorație galbenă, datorită diacetildihidrolutidinei :



Reactiv acetilacetonă: Se dizolvă în apă distilată, 25 g acetat de amoniu, se adaugă 2 ml acid acetic glacial, 0,2 ml acetil acetonă şi se aduce la 100 ml apă distilată.
Metoda este specifică. Sensibilitatea 0,2 μg/ml.
Reacții de diferențiere a formaldehidei de alte aldehide.
a. Reacția cu nitroprusiat: la tratarea soluției de analizat cu 1 ml nitroprusiat 15 se formează o colorație albastră în prezența formaldehidei şi roşie în prezența acetaldehidei.
b. Reacția van Bok: la tratarea soluției de analizat cu benzidină soluție 1% în acid acetic, se formează, în prezența formaldehidei, o colorație galben -portocalie,care prin încălzire, trece în roşu deschis. În aceleaşi condiții, benzaldehida dă o colorație gălbuie, apoi un precipitat galben.
C. Dozare din aer
1. Metoda spectrofotometrică cu fenilhidrazină pentru formaldehidă
Principiu
Formaldehida se condensează cu fenilhidrazina, trecând în fenilhidrazonă, care, cu fericianura de potasiu în mediu acid, dă un compus chinoniminic, roşu, colorimetrabil.



Sensibilitatea metodei este de 0,1 μg/ml. Reacția nu este specifică, fiind date de alte aldehide şi alți reducători.
Reactivi

1. Soluția absorbantă fenilhidrazinăclorhidrică,soluți 1%. Se dizolvă 1g fenilhidrazină clorhidrică în 2 ml HCl d = 1,19 şi se aduce la 100 ml cu apă. Se agită energic şi la nevoie, se filtrează prin frită de sticlă. Se prepară extemporaneu.
2. Acid clorhidric (d = 1,19)
3. Fericianură de potasiu, soluție 2%. Se prepară extemporaneu.
4. Soluție standard stoc. Se diluează 0,5 ml soluție de formaldehidă 40%, cu apă, la 100 ml şi se stabileşte iodometric conținutul exact în formaldehidă, astfel: într-un Erlenmyer cu dop rodat, se introduc 2 ml soluție standard, 20 ml soluție iod 0,1 N şi 10 ml NaOH 1N, acoperindu-se imediat cu dopul. Se agită şi se lasă 10 minute la întuneric. Se adaugă 12 ml acid sulfuric 1 N şi se titrează iodul pus în libertate cu soluție de tiosulfat de sodiu 0,1 N, cu soluție de amidon indicator. La 1 ml de iod 0,1 N corespund 1,502 mg formaldehidă. Soluția de formaldehida se prepară extemporaneu.
5. Soluția standard de lucru. Se diluează soluție standard stoc cu apă pentru a obține o soluție cu 10 µg formaldehidă/ml.

Recoltarea probelor

Se aspiră minimum 10 litri aer, cu un debit de 0,5 litri/minut, printr-un absorbitor conținând 10 ml soluție absorbantă.

În afară de absorbitoarele destinate recoltării de probe se prevăd încă două absorbitoare cu câte 10 ml soluție absorbantă, care se transportă în teren, fără a aspira aer prin ele, constituind probele martor.

Modul de lucru

Se transvazează conținutul fiecărui absorbitor, cantitativ în câte o eprubetă gradată, completându-se eventual, la 10 ml. Se iau 5 ml soluție absorbantă, se adaugă 1 ml HCl conc. şi 0,5 ml fericianură 2% agitându-se. În paralel se prelucrează ți probele martor.

Se măsoară extincția după 15 – 30 minute, la spectrofotometru, la λ = 530 nm, în cuva de 1 cm, față de martor. Curba de etalonare se întocmeşte între 5 şi 25µg, prin puncte din 5 în 5, în condițiile descrise mai sus. Valorile extincțiilor pentru probe se raportează la curba etalon, apoi se înmulțesc cu 2 (pentru că s-a lucrat cu ½ din soluția absorbantă), obținându-se concentrația C, a formaldehidei, în µg, în probă.

Reactivi(ml)	Eprubeta					
	1	2	3	4	5	6
Standard de lucru (10µg CH_2O/ml)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	-
Conc. µg.	5	10	15	20	25	-
Fenilhidrazină 1%	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	5.0
HCl conc.	1					
$K_3[Fe(CN)_6]$ 2%	0.5 Agitare , repaus 20-30 minute					

Calcul:

Rezultatele se exprimă în mg formaldehidă / m^3 aer:

mg formaldehidă/m^3 aer = C / V

în care:
C = concentrația formaldehidei, în µg.
V = volumul de aer recoltat, în litri.
Normele republicane în vigoare prevăd pentru formaldehidă CMA = 3 mg/m^3 aer.

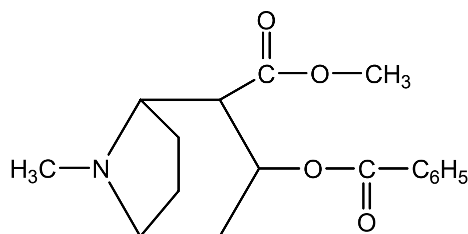
Bibliografie

G. Drochioiu, I. Mangalagiu, I. Druță, Elemente de teorie şi practică toxicologică. Edit. Demiurg, Iaşi, 2001.
M. Cotrău, Implicații ale consumului de etanol în industria chimică. M.I.Ch., Iaşi, 1983.
M. Proca, E. Butnaru, L. Agoroaei – Lucrări practice de toxicologie. Universitatea de medicină şi farmacie "Gr. T. Popa" Iaşi, Centrul de multiplicare UMF, Iaşi, 1996.

Cap. XI. Drogurile: între plăcere şi moarte

Drogurile au fost consumate de vraci, şamani, inițiați pentru a intra în planurile superioare ale existenței, după cum au afirmat aceştia. Acestea pot însă fi folosite de laici, care, necunoscându-le valoarea adevărată şi abuzând utilizarea lor ajung la epuizarea corpului, degradarea sa şi chiar la moarte. O carte interesantă despre toxicologia medico-legală a drogurilor a fost scrisă de mai mulți specialişti sub redacția Castiglioni, S., Zuccato, E., Fanelli, R în 2011. Aceasta cuprinde între altele, metabolismul şi excreția drogurilor folosite de oameni (Manuela Melis, Sara Castiglioni, şi Ettore Zuccato). Dintre droguri este studiată intens cocaina şi metaboliții săi (Alexander L.N. van Nuijs, Lieven Bervoets, Philippe G. Jorens, Ronny Blust, Hugo Neels, and Adrian Covaci). Pentru depistarea drogurilor autorii recomandă spectrometria de masă şi spectrometria de masă cuplată cu lichid-cromatografia (Félix Hernádez, Juan V. Sancho, and Lubertus Bijlsma). Prezența drogurilor în apa de băut sau în particolele de praf este, de asemenea discutată.

Analizele de laborator
Determinarea cocainei



A. Izolare

a. Izolare din organe: se extrage din soluție apoase alcaline, cu următoarele precauții, spre a evita hidroliza: macerarea se execută la rece; operația de extragere se execută se conduce rapid, se execută la temperatura laboratorului sau la un curent de aer; din hidroliză rezultă metanol, care se poate identifica.

b. Izolare din vomă, conținut stomacal, lichide biologice: se extrage cu eter (cloroform) din produsul alcalinizat la pH = 8 cu bicarbonat.

c. Izolare de pe mucoasa nazală (la cocainomani): se prelevă mucozitățile cu ajutorul unui tampon de vată, care apoi este extras cu eter (cloroform).

B. Identificare:

1. Reacții de precipitare:

a. Cocaina dă precipitate cu reactivi generali de precipitare ai alcaloizilor.

- Reziduul tratat cu 2-3 picături reactiv Hager când se formează un precipitat galben (sensibilitatea 1: 1000).
- Reziduul tratat cu 2-3 picături reactiv Bouchardat formează un precipitat brun (1 : 50000).
- Reziduul tratat cu 2-3 picături reactiv Mayer formează un precipitat alb-gălbui.

- Reziduul dizolvat în 1-2 picături de acid sulfuric 10% se tratează cu 2 ml soluție permanganat de potasiu 3,5% când apare un precipitat violet, care, la microscop, se prezintă sub formă de cristale rectangulare, unele întrepătrunse.
- Reziduul se dizolvă în puțină apă acidulată, se adaugă câteva picături bicarbonat de potasiu 55 şi 2-3 picături acid clorhidric 10%. În prezența cocainei se obține un precipitat galben.

2 Reacții de culoare:

a. Reacția Pesez (variantă a reacției Vitali): reziduul se tratează cu 2-3 picături de acid azotic concentrat şi 10-15 picături acid sulfuric concentrat. Se solubilizează cu ajutorul unei baghete şi se încălzeşte 10-15 minute pe baia de apă. Se răceşte şi se adaugă 1 ml de apă, când apare culoare galbenă strălucitoare. Se transvazează într-o eprubetă şi se adaugă 1 ml acetonă. Se răceşte şi se agită puternic cu 5 ml hidroxid de sodiu 50%. Faza apoasă rămâne galbenă, iar la zona de contact cu acetona apare un inel albastru-violaceu, care prin agitare, care prin agitare, difuzează în toată masa acetonică. Culoarea albastră trece în violet, şi în final în roşu închis.

b. Reacția Ferreira de Silva: se nitrează reziduul cu câteva picături de acid azotic concentrat şi se evaporă la sec. Reziduul cald este tratat cu câteva picături de potasiu 10% în alcool. se dezvoltă un miros de benzoat de etil, sau dacă alcaloidul este în cantitate mare, o colorație roşie purpurie.

c. Reacția Guerbert: (v. atropina).

d. reziduul se tratează cu 0,5 ml acid sulfuric concentrat şi câteva cristale de iodat de potasiu. Se încălzeşte pe baia de apă până încep să se formeze vapori albi de trioxid de sulf. În acest moment apare o culoare brună, care virează treptat în verde oliv, albastru- violet.

3. Reacția de miros: reziduul tratat cu acid sulfuric concentrat şi încălzit pe B.M. şi diluat cu 2 ml apă dă un miros de benzoat de etil.

4. Diferențierea cocainei de atropină prin reacția Fesez (tabelul nr.7)

Diferența se face pe baza colorației fazelor, astfel::

Tabelul nr.7

	Cocaina		Atropina	
Faza	fără NaOH	cu NaOH	fără NaOH	cu NaOH
Apoasă	galben	galben	incoloră	incoloră
Acetonică	incoloră	Albastru-violet Roșu-bordo	galben	albastru

5. Cromatografie pe strat subțire:

a. Faza staționară: plăci silicagel G Merck, activitate la 110°, o oră.

b. Faza mobilă: cloroform: metanol (9 : 1), amoniac concentrat : metanol (1,5 : 100)

c. Proba de analizat: extract cloroformic bazic.

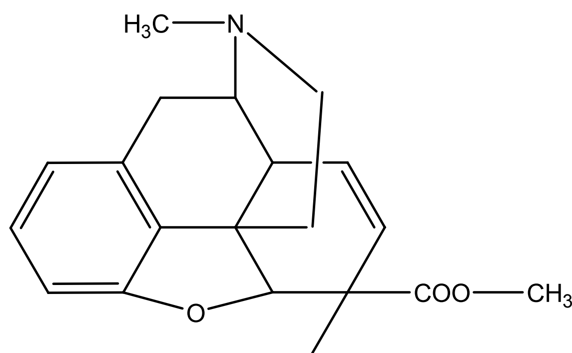
d. Martor: cocaină în cloroform.

e. Revelare: plăcile se usucă în atmosferă şi se stropesc cu reactiv iodoplatinat acidulat (Rf = 0,60).

6. Test fiziologic.

Cocaina aplicată pe vârful limbii determină anestezie. Instilată în ochiul de pisică sau iepure, provoacă midrează (celălalt ochi serveşte drept martor).

HEROINA (DIACETIL MORFINA)



A. Izolare:

Heroina se izolează din produşii de analizat prin extracţie cu cloroform din mediu alcalin.

B. Identificare:

1. Reacţii de precipitare:

Reziduul obţinut prin evaporarea extractului cloroformic se tratează ci 1-2 picături clorură mercurică 5% când apare un precipitat sub formă de dendrite.

2. Reacţii de culoare:

a. Reziduul reluat cu 2-3 picături reactiv Marcquis de dezvoltă o coloraţie vişinie.

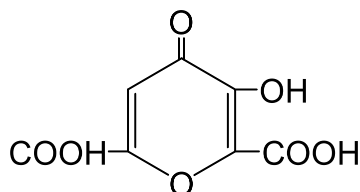
b. Reziduul reluat cu 2-3 picături reactiv Mandelin dezvoltă o coloraţie albastră-cenuşie.

d. Reziduul de heroină dă reacţia Vitali obţinându-se o coloraţie verde - măslinie.

f. Soluţia apoasă de heroină se încălzeşte cu clorhidrat de hidroxilamină în mediu alcalin când se formează acid hidroxamic (de la radicalul acetil). După neutralizare, se tratează cu clorură ferică 1% când apare roz – violacee, colorimetrabilă (reacţia Waxmuth).

Diferenţierea intoxicaţiei cu morfină de intoxicaţia cu preparat din opiu

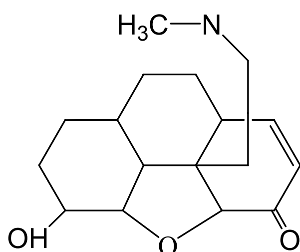
Intoxicaţia cu preparat din opiu se diferenţiază de acea cu morfină, prin identificarea acidului meconic, prezent în opiu în concentraţie de 5-10%. Acidul meconic se extrage prin metoda Stas în mediu acid, cu eter. Pentru purificare, reziduul de la evaporarea eterului acid se reia cu apă şi se epuizează de câteva ori cu benzen în care acidul meconic este insolubil. Se separă prin centrifugare cele două faze. Reziduul fazei apoase este reluat cu eter care extrage acidul meconic. Soluţia eterică tratată cu câteva picături de clorură ferică 1% dă o coloraţie roşie. Culoarea este stabilă în timp şi în prezenţa acidului clorhidric cea ce diferenţiază acidul maconic de sulfocianuri şi acetaţi.



IV.1.10.3 HIDROMORFONA SAU DILAUDID

A. Izolare:

Se extrage din soluția apoasă amoniacală după metoda Stas-Otto-Origer.



B. Identificare:

1. Reacții de precipitare:

Reziduul reluat cu 2-3 picături de nitroprusiat de sodiu 10% formează cristale sub formă de prisme sau baghete.

2. Reacții de culoare.

a. Cu reactivul Marque dezvoltă o colorație galbenă-rpşie purpurie.

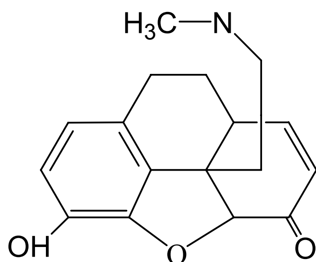
b. Cu reactivul Mandelin dezvoltă o colorație vişinie închis, apoi portocalie .

c. Cu reactivul Fröhde dezvoltă o colorație vişinie bleu, care trece la verde.

d. Reacția Vitali se dezvoltă o colorație galbenă-galben portocalie.

e. Cu clorura ferică 3% apare o colorație albastră.

IV. 1.10.4. NALORFINA (SIN. LETHIDRONE) N-ALILNORMOFINA



1. Reacții de precipitare:

a. Cu bicromatul de potasiu 10% apare un precipitat sub formă de stea.

b. Reactiv Mayer- se obține un precipitat sub formă de stea sensibilitatea reacției este de 1 : 400).

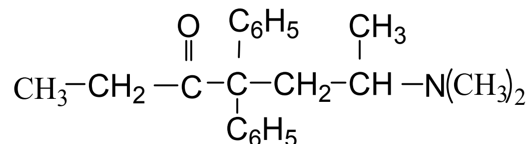
2. Reacții de culoare:

a. Reactivul Marquis dezvoltă o colorație vişinie.

b. Reactivul Fröhde dă o colorație bleu, ce trece în verde.

c. Testul Vitali – dezvoltă o colorație galbenă-galben portocalie.

IV.1.11.2.<u>METADONA (SIN. SINTALGON, DOLOPHINE, MECADIN</u>



1. Reacția de precipitare:

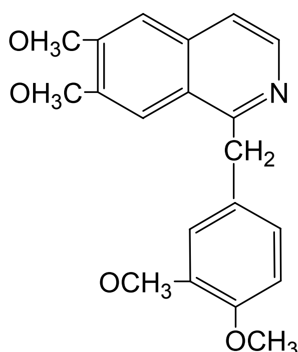
a. Reactivul Hager – reziduul se reia cu 2-3 picături reactiv Hager când se formează un precipitat galben; se adaugă 5 ml eter şi se agită, precipitatul se dizolvă (deosebire de petidină).

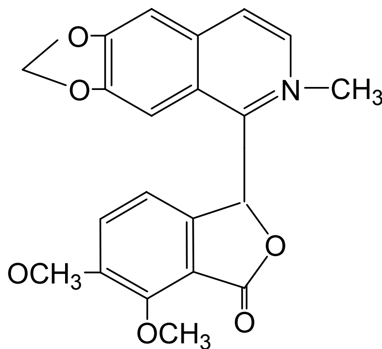
b. Reziduul reluat cu clorură mercurică 5% formează un precipitat alb sub formă de rozetă (sens. 1 : 3000).

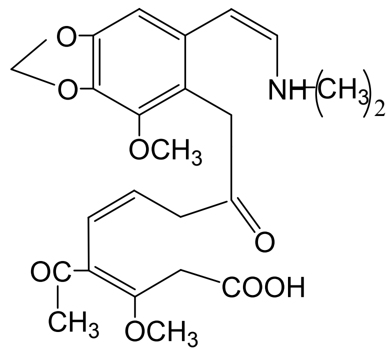
2. Reacții de culoare:

a. Rezduul reluat cu 2-3 picături reactiv Mandelin dezvoltă o colorație verde care trece în albastru.

Determinarea papaverinei







Papaverină Narcotină Narceină

A. Izolare:

Papavelina, narcotina şi narceina se izolează din soluția apoasă alcalină sau acidă cu cloroform.

B. Identificare:

1. Reacții de precipitare:

Papavelina, noscapina şi narcina dau precipitate cu reactivii generali de precipitare ai alcloizilor pe o soluție de clorhidrat sau sulfat de alcaloid: reziduul rămas pe sticlă de ceas după evaporarea solventului este reluat cu câteva picături acid clorhidric sau sulfuric 10% şi se evaporă la sec pe baia de apă. Reziduul care reprezintă alcloidul salifiat este tratat cu reactivii generali de precipitare ai alcaloizilor:

a. Reziduul tratat cu 1-2 picături reactiv Hager dă un precipitat galben (sensibilitatea 1 : 500).

b. Reziduul tratat cu 1-2 picături reactiv Bouchardat dă un precipitat roşu închis.

c. Reziduul tratat cu 1-2 picături reactiv Mayer dă un precipitat alb.

d. Reziduul tratat cu 1-2 picături reactiv Drangendorff dă un precipitat roşu portocaliu.

e. Reziduul tratat cu 1-2 picături reactiv Marmé dă un precipitat alb, sub formă de rouetă.

f. Reziduul reluat cu clorură de zinc 5% dă un precipitat sub formă de buchet.

2. Reacții de culoare:

Papavelina.

a. Reziduul tratat cu 2-3 picături reactiv Erdmann dă o colorație albastră-verde, care trece în roşu închis.

b. Reziduul tratat cu 2-3 picături acid sulfuric concentrat prezintă la încălzire o colorație violet (deosebire de morfină).

c. Reziduul tratat cu 2-3 picături reactiv Fröhde dă o colorație verde ce trece în albastră, iar la încălzire în roşie vişinie.

d. Reziduul tratat cu 2-3 picături reactiv Marquis dă o colorație galben- verde, care trece în roz-roşu şi apoi în brun (deosebire de morfină şi esterii săi).

e. Reziduul tratat cu 2-3 picături reactiv Mandelin dă o colorație verde albastră care trece în albastru.

f. Reziduul tratat cu un cristal fericianură de potasiu 10% şi câteva picături reactiv Marquis dă o colorație albastră-verde care trece succesiv în violet, verde, galben.

Noscapina (Narcotina)

a. . Reziduul tratat cu 2-3 picături acid sulfuric concentrat dă o colorație galben-verde care trece succesiv în portocaliu şi roşu vişiniu.

b. Reziduul tratat cu 2-3 picături reactiv Marquis dă o colorație galben-verde ce virează la roşu-violet, apoi la verde oliv şi la galben (deosebire de morfină: culoarea purpur virează la bleu).

c. Reziduul tratat cu 2-3 picături reactiv Fröhde dă o colorație verde.

Narceina

a. Reziduul tratat cu 2-3 picături reactiv Fröhde dă o colorație verde

b. Reziduul tratat cu 2-3 picături reactiv Marquis dă o colorație brună ce trece în verde.

c. Reziduul tratat cu 2-3 picături reactiv Madelin dă o colorație verde-brun.

d. Reziduul tratat cu 2-3 picături soluție apoasă de iod 1% dă o colorație(sau precipitat) albastră.

3. Fluorescența

Reziduul de papavelină dizolvat la cald în anhidridă acetică şi tratat cu câteva picături de acid sulfuric concentrat dă o culoare verde-galbenă, fluorescentă în U.V.

Cap. XII. Otrăvirea cu medicamente

1. Toxicologia medicamentelor

Spectrul efectelor exercitate de medicamente cuprinde efecte benefice şi efecte nedorite în raport cu circumstanțele în care sunt utilizate. Efectele toxice decurg fie din acțiunea farmacologică primară (care reprezintă baza indicației terapeutice) - exagerată în situația dată - fie din acțiuni fără legătură cu aceasta, incluzând aici citotoxicitatea directă şi perturbări ale proceselor metabolice.

Intensitatea efectelor toxice depinde în general de concentrația toxicului în organism, mai precis de locul său de acțiune.

Excreția, în special prin rinichi, este o modalitate de epurare, valabilă pentru multe medicamente. Ea interesează în general molecule purtătoare de sarcini electrice depline sau parțiale, care nu sunt liposolubile.

Medicamentele, cu excepția celor macromoleculare (sau în formă legată de proteinele plasmatice), filtrează glomerular. Moleculele liposolubile se absorb tubular, rămânând în organism, cele neliposolubile sunt reținute în urină şi se elimină. Unele medicamente fac de asemenea obiectul secreției tubulare, care implică mecanisme transportoare specifice.

Medicamentele care sunt epurate total sau în mare parte prin excreție renală - de exemplu antibioticele aminoglicozidice de felul gentamicinei, majoritatea curarizantelor, digoxina - trebuie administrate în doze mici sau evitate (după caz) în insuficiența renală. Vârsta înaintată, care presupune un grad de insuficiență renală funcțională, obligă de asemenea la prudență în dozare.

Eliminarea renală poate fi obiectul unor interacțiuni semnificative clinic. Astfel, alcalinizarea urinii prin bicarbonat de sodiu creşte proporția formei ionizate de salicilați (care au molecula acidă) în urină; aceasta micşorează reabsorbția tubulară, mărind eliminarea renală, fenomen util în intoxicația acută cu acid acetilsalicilic. Un alt exemplu este probenecidul, un medicament cu molecula acidă, care intră în competiție cu benzilpenicilina, de asemenea cu molecula acidă, pentru transportul specific ce intervine în secreția tubulară;

de aceea probenecidul scade eliminarea urinară a penicilinei şi poate fi utilizat pentru creşterea nivelului plasmatic de antibiotic.

Clearance-ul medicamentelor

Clearance-ul este un parametru farmacocinetic primar, care arată viteza de epurare relativ la concentrația medicamentelor în lichidele biologice. Clearance-ul se exprimă obişnuit relativ la plasmă-*clearance plasmatic* (Cl_p), care reprezintă volumul de plasmă epurat de medicament pe unitatea de timp.

$Cl_p=V/C_c$

în care V notează viteza de introducere a medicamentului în perfuzie intravenoasă, iar C_c –concentrația plasmatică constantă.

Clearance-ul plasmatic exprimă *clearance-ul sistemic* sau *total* (Cl_t). El reuneşte componenta hepatică a epurării (Cl_h), cea renală (Cl_r) şi cea datorită altor organe (Cl_{al}):

$Cl_t=Cl_h+Cl_r+Cl_{al}$

Cunoaşterea clearance-ului este importantă pentru că permite aprecierea perioadei cât medicamentul rămâne în organism, respectiv a duratei efectului. Valoarea clearance-ului hepatic şi renal arată contribuția celor două organe de epurare. Clearance-ul renal mare al unui medicament - de exemplu gentamicina - semnifică că acesta trebuie folosit cu prudență, în doze mici sau evitat în prezența insuficienței renale.

Timpul de înjumătățire

Timpul de înjumătățire este timpul necesar scăderii la jumătate a concentrației de medicament în plasmă. Acest parametru depinde la început mai ales de distribuția medicamentului, apoi predominant de epurarea sa. Pentru majoritatea medicamentelor el se exprimă prin relația:

$T_{1/2}=0,693 \times V_d/Cl_p$

în care 0,693 este logaritmul natural de 2.

Cunoaşterea timpului de înjumătățire este utilă pentru stabilirea posologiei şi intervalului între doze.

Medicamentele îşi datoresc efectele interacțiunii cu materia vie. Majoritatea acționează *specific* asupra unor anumite structuri macromoleculare prezente în cantitate mică în țesuturile țintă. Consecutiv sunt declanşate fenomene secvenționale multiple, reacții şi contrareacții, care se manifestă la diferite domenii dimensionale: celule, țesuturi, sisteme, organe şi în final, la nivelul organismului întreg.

Acțiunea medicamentelor la nivel molecular şi celular

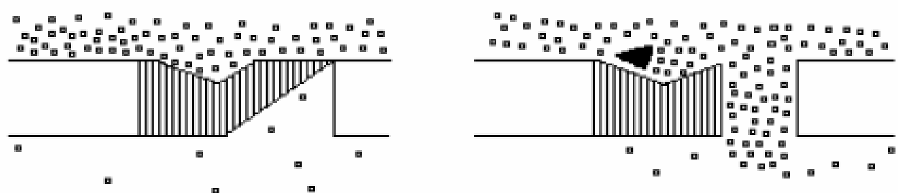
Acțiunea primară a medicamentelor se exercită asupra moleculelor şi reprezintă *mecanismul de acțiune.*

Farmacoreceptorii sunt macromolecule proteice capabile să lege specific substanțe active cu molecula relativ mică, formând cu acestea complexe, care comandă anumite efecte biologice. Multe medicamente folosesc drept receptori macromolecule, care în mod obişnuit

sunt acționate specific de molecule fiziologice - neurotransmițătorii autacoizi, hormoni şi alți compuşi activi proprii organismului.

Receptorii recunosc specific semnalul chimic reprezentat de anumite molecule. Aceasta se datoreşte existenței la suprafața macromoleculei a unui *sediu de legare* complementar chimic, electric şi /sau ca organizare spațială cu molecula medicamentoasă (sau endogenă). Capacitatea de a se fixa specific de anumiți receptori este denumită *afinitate*. Formarea *complexului medicament-receptor* se realizează prin stabilirea unor legături între molecula de medicament şi sediul de legare. Legăturile sunt de regulă labile şi constau în legături ionice, punți de hidrogen, forțe van der Waals. Medicamentul se leagă şi se desface de receptori cu repeziciune şi de repetate ori. Mai rar legarea este stabilă şi puternică (legături covalente) ceea ce determină un efect prelungit, deseori cu caracter toxic.

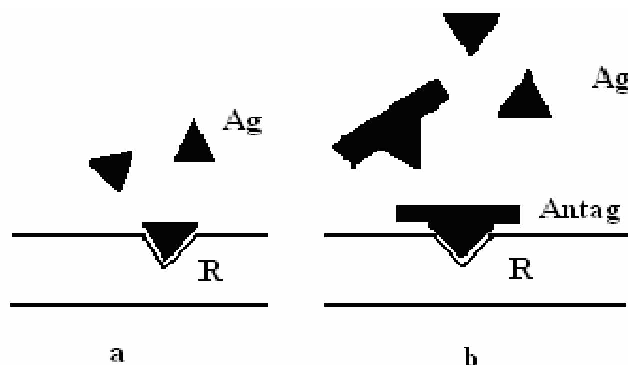
În cazul substanțelor denumite *agoniste*, formarea complexului medicament-receptor declanşează fenomene fizico-chimice şi /sau biochimice, cu repercusiuni funcționale. În acest caz medicamentul are, pe lângă afinitate, *activitate intrinsecă*. Fenomenul inițial constă probabil în *modificări conformaționale* ale macromoleculei receptoare, care determină, direct sau indirect, modificări ale permeabilității membranare, modificări de activitate enzimatică, modificări ale unor mecanisme transportoare.



Modificarea conformațională a unei macromolecule receptoare (haşurat), inclusă in membrană, ca urmare a acționării specifice de către o moleculă medicamentoasă (negru plin); consecutiv se deschide un canal membranar prin care trec ionii, conform gradientului de concentrație (schemă imaginară)

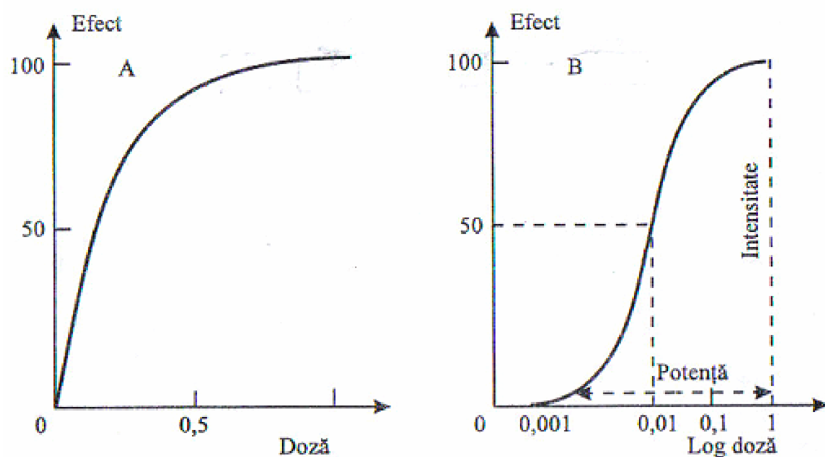
Cuplul medicament-receptor inițiază intrarea în funcție a unor *mecanisme amplificatoare* - reacții enzimatice secvențiale în cascadă, acțiuni progresiv mai ample sau mai îndelungate pentru fiecare treaptă, transformări de energie. Aşa se explică consecințele funcționale majore ale unor acțiuni primare foarte modeste cantitativ.

O altă categorie de medicamente – *antagoniste* - au afinitate, dar fixarea de receptori este imperfectă şi nu poate declanşa fenomenele responsabile de activitatea biologică. Asemenea substanțe sunt denumite antagoniste deoarece împiedică fixarea de receptori, respectiv acțiunea substanțelor agoniste.Antagonismul are obişnuit caracter *competitiv*, cele două categorii de substanțe, agoniste şi antagoniste, intrând în competiție pentru sediul de legare de pe macromolecula receptoare.



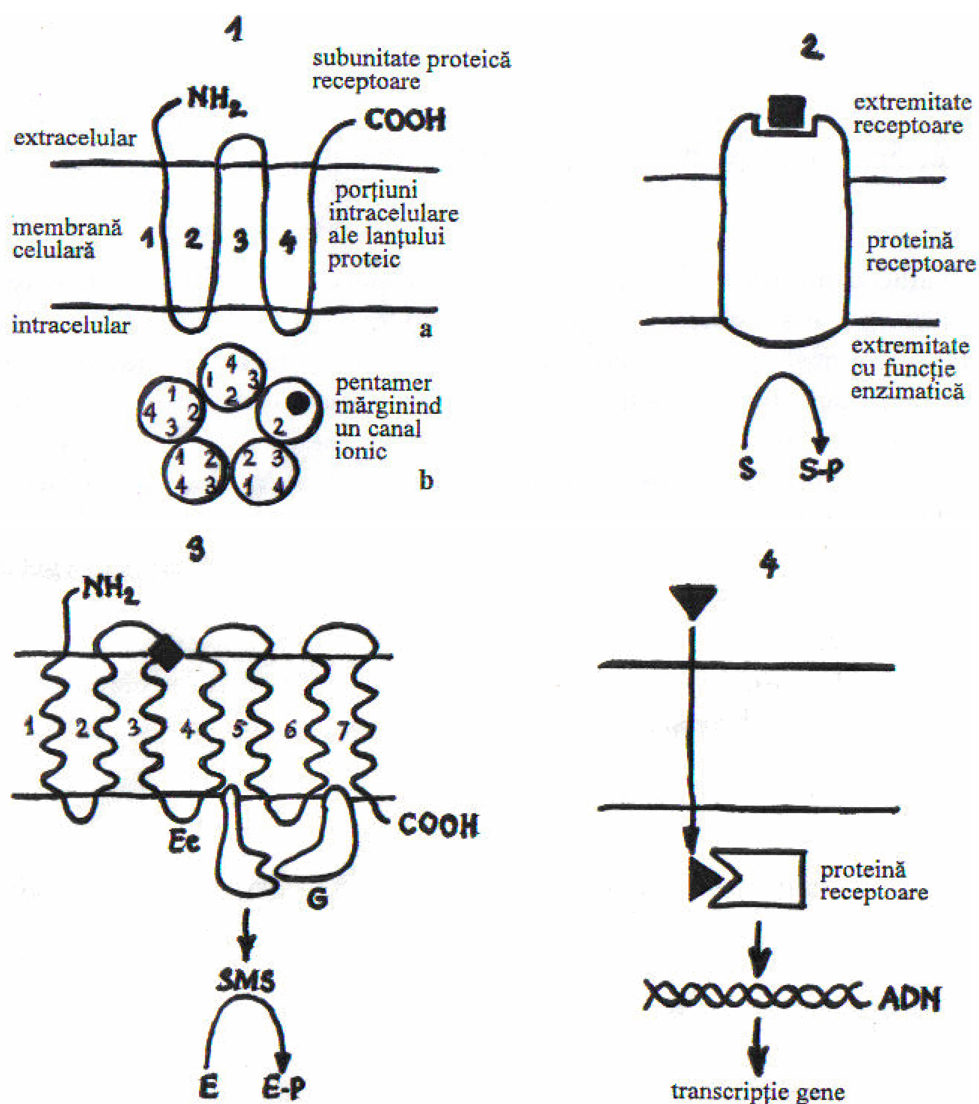
Comportarea moleculelor agoniste (Ag) - (a) si comportarea moleculelor antagoniste (Antag) - (b) la nivelul receptorilor specifici (R)

Curba concentrației de medicament (sau doză) - efect este hiperbolică cu convexitatea în sus. Înscrierea semilogaritmică realizează o curbă sigmoidă. Centrul de simetrie din porțiunea mijlocie a curbei defineşte doza care produce 50% din efectul maximal. Atunci când substanța se cuplează cu toți receptorii disponibili şi îi acționează efectul este maximal. Eficacitatea maximă indică *intensitatea de acțiune* a unui medicament, figurată prin înălțimea curbei proiectată pe ordonată. *Potența*, care exprimă domeniul dozelor eficace, este figurată prin proiecția curbei pe ordonată.



Curba hiperbolică de doză – efect (A) şi curba sigmoidă log (doză – efect) (B).

Primele cunoştințe despre *structura şi organizarea receptorilor* s-au referit la suprafața de legare, considerând caracterul complementar între acestea şi moleculele pe care le recunoaşte. Folosirea de liganzi specifici şi tehnici complexe de identificare, izolare, dozare şi analiză chimică au lărgit sfera cunoştințelor. Studii farmacodinamice, utilizând liganzi specifici au evidențiat diferite familii, tipuri şi subtipuri de receptori. În ultimii ani s-a reuşit clonarea genelor responsabile de sinteza proteinelor receptoare, ceea ce a permis realizarea unor asemenea macromolecule recombinate.



Cele patru tipuri de receptori membranari: 1-receptor membranar înglobând un canal ionic; a-subunitate proteică receptoare; b-pentamer format din subunităţile proteice care mărginesc canalul ionic efector; 2-receptor membranar cu funcţie enzimatică; 3-receptor membranar î serpentină, cuplat cu o proteină reglatoare; 4-receptor intracelular care se leagă de ADN (S şi S-P = substrat, respectiv substrat fosforilat, G = proteină reglatoare dependentă de GTP, Ee = enzimă efectoare, SMS = sistem mesager secund, E şi E-P = enzimă, respectiv enzimă fosforilată; molecula de agonist este redată haşurat)

Conform cunoştinţelor actuale receptorii pot fi încadraţi în patru superfamilii în funcţie de organizarea lor structurală şi de sistemele cu care sunt conectaţi. Receptorii pot fi situaţi în membrana celulară sau intracelular. *Receptorii membranari* sunt proteine integrale înglobate în membrana celulară, cu o extremitate care proemină în exterior şi alta în interior. *Receptorii intracelulari* sunt proteine specifice situate în citoplasma şi în cromatina nucleară.

O primă categorie de receptori este reprezentată de *recetorii-canal ionic*. Aceştia sunt formaţi dintr-o proteină, care include sau mărgineşte un canal membranar ionic, astfel

receptorii colinergici nicotinici include un canal pentru ionii de sodiu şi potasiu, iar receptorii $GABA_A$ include un canal pentru ionii de clor. Acţionarea unor asemenea structuri macromoleculare determină deschiderea (sau închiderea) canalului respectiv, cu modificarea încărcării electrice membranare, respectiv depolarizare şi fenomene de excitaţie sau hiperpolarizare şi inhibiţie.

O a doua categorie de receptori membranari sunt *receptorii-enzime*. Ei constau în proteine transmembranare, care au un sediu de legare pe suprafaţa extracelulară şi activitatea enzimatică în porţiunea dinspre interiorul celulei. Acţionarea acestor receptori determină modificarea directă a activităţii enzimatice corespunzătoare, cu consecinţe metabolice şi funcţionale. Insulina şi anumiţi factori trofici activează receptori cu funcţie protein-kinazică.

A treia categorie de receptori, de asemenea membranari, mai complecşi, sunt *receptorii cuplaţi cu proteine G sau receptorii în serpentină*. Ei cuprind o proteină prevăzută cu un sediu de legare, cuplată cu o altă proteină denumită proteină G şi, prin aceasta, cu o enzimă membranară importantă. Prima proteină, cu funcţie *receptoare* propriu-zisă este cudată, traversând de şapte ori membrana celulară; agonistul se fixează pe suprafaţa externă. Modificarea conformaţională, care urmează activării proteinei receptoare, se transmite la o *proteină G*, a cărei funcţie este dependentă de GTP.Au fost descrise câteva tipuri de proteină G, notate cu diferite litere mici: Gs, Gi (s şi i de la stimulant, respectiv inhibitor), Gq, Go. Proteina G este cuplată pozitiv (stimulator) sau negativ (inhibitor) cu o anumită *enzimă membranară* capabilă să pună în funcţie metaboliţi majori pentru economia metabolică celulară denumiţi *mesageri secunzi* (mesagerii primi ai informaţiei sunt reprezentaţi de moleculele care acţionează receptorii).

Principalele enzime membranare, care pun în funcţie mesageri secunzi, sunt adenilat ciclaza şi fosfolipaza C. *Adenilat ciclaza* catalizează transformarea ATP în AMP_c (adenozin monofosfat ciclic). *Adenilatul ciclic*, un mesager secund, activează protein kinaze specifice, cu declanşarea unor procese de fosforilare şi activare enzimatică secvenţială. *Fosfolipaza C* este o enzimă membranară care desface, din fosfatidilinozitol, *inozitol trifosfat* (ITP) şi *diacil gliceroli* (DAG). Aceşti metaboliţi reprezintă un sistem mesager secund. ITP stimulează eliberarea de *ioni de calciu* din depozitele celulare; calciul cuplat cu calmodulina (o proteină specifică) activează anumite protein kinaze, cu fosforilări în lanţ consecutive. DAG împreună cu ionii de calciu activează protein kinaza C, o altă enzimă fosforilantă. Catecolaminele, acetilcolina, serotonina, opioizii îşi datoresc parte din efectele modificării sistemelor mesagere secunde reprezentate de adenilatul ciclic şi de ITP – DAG / Ca^{2+}, ca urmare a activării anumitor receptori specifici.

1. Proteină receptoare	Proteină receptoare
	
2. Proteină G	Proteină G
	
3. Adenilat ciclază	Fosfolipaza C
	



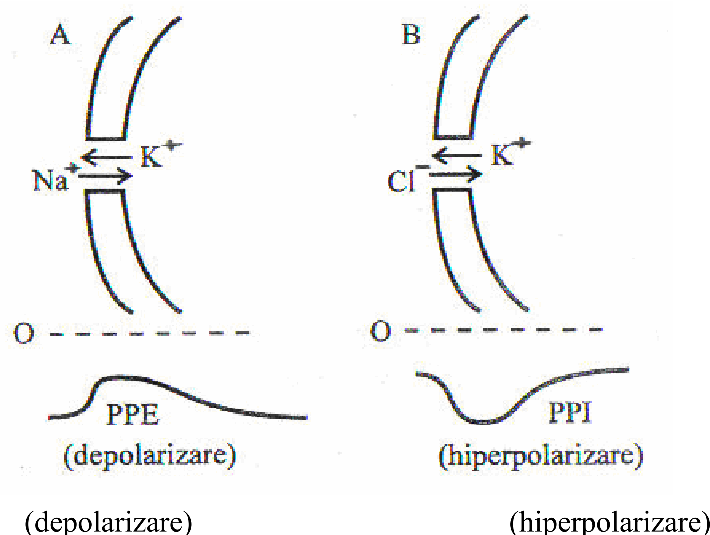
Etapele care urmează activării receptorilor cuplaţi cu proteine G-1, 2; 3-enzima membranară modificată consecutiv; 4-mesagerul secund; 5-enzimele activate de mesagerul secund; 6-răspunsul celular consecutiv

Receptorii aparţinând unei a patra categorii, au o componentă citoplasmatică şi o alta la nivelul cromatinei nucleare, de unde denumirea de *receptori nucleari*. Moleculele care acţionează la nivelul acestor receptori (steroizi hormonali, vitamina D, hormoni tiroidieni) sunt solubile în grăsimi şi pătrund cu uşurinţă în celulele ţintă. Ajunse în citoplasmă se fixează de o macromoleculă receptoare complexă. Prin pierderea consecutivă a unor proteine asociate acestei macromolecule se formează un complex activ, care ajunge în nucleu unde se fixează de ADN la nivelul unui situs specific. Ca urmare sunt reglate pozitiv sau negativ anumite gene alăturate, receptorii nucleari având funcţie de *factori de trascripţie*. Modificarea sintezei unor proteine enzimatice sau de altă natură este responsabilă de efectul final.

Timpul în care se evidenţiază efectele acţionării receptorilor depinde de felul acestora. În cazul modificării directe a canalelor membranare sau a funcţiei unei enzime efectul apare foarte repede. Pentru receptorii cuplaţi cu proteine G efectele se instalează ceva mai lent, deoarece implică sisteme mesagere secunde şi secvenţe metabolice multiple. Efectele acţionării receptorilor nucleari se dezvoltă după o perioadă de latenţă, deoarece ele presupun modificarea sintezei unor proteine.

Acţiunile medicamentelor asupra canalelor membranare şi mecanismelor transportoare

Canalele membranare sunt pori apoşi incluşi în proteine membranare sau mărginiţi cu acestea. Canalele permit trecerea prin difuziune controlată a ionilor de sodiu, calciu, potasiu, clor, conform gradientului de concentraţie. De asemenea, pot fi traversate de anumite molecule hidrosolubile de dimensiuni mici. Trecerea pasivă a ionilor de sodiu şi a celor de calciu determină depolarizare, respectiv generează potenţialul post-sinaptic excitator şi potenţialul de acţiune, cu excitaţie consecutivă. Efluxul ionilor de potasiu şi influxul ionilor de clor determină hiperpolarizare, respectiv potenţial postsinaptic inhibitor.



(depolarizare) (hiperpolarizare)

Permeabilizarea membranelor prin medicamente, cu translocarea ionică consecutivă: A – depolarizare şi generarea potenţialului excitator (PPE); B – hiperpolarizare, potenţial postsinaptic inhibitor (PPI)

Canalele membranare sunt prevăzute cu *mecanisme de poartă*, care pot fi manevrate prin influențe electrice sau chimice. Astfel depolarizarea este recepţionată de un *senzor de voltaj* şi poate comanda deschiderea canalelor, exemple sunt canalele de calciu voltaj dependente. Canalele dispun, de asemenea, de locuri de legare specifice pentru anumite molecule, reprezentând *senzori chimici*. Asemenea molecule pot determina, direct sau prin intermediul unor mecanisme receptoare, deschiderea sau închiderea, modificând procesele de translocare ionică, cu consecinţe funcţionale.

Diferiţi compuşi endogeni, medicamente, toxice, acţionează asupra canalelor membranare, astfel, acetil colina deschide canalele pentru Na^+ şi K^+ de la nivelul plăcii motorii, ca urmare a acţionării receptorilor colinergici nicotinici; consecutiv, este stimulată musculatura striată. GABA acţionează receptorii $GABA_A$ şi deschide canalele pentru Cl^- la nivelul unor neuroni din SNC, cu inhibiţie consecutivă; benzodiazepinele favorizează acest fenomen, ceea ce explică efectul tranchilizant. Blocantele canalelor calciului îşi datoresc efectele farmacologice blocării canalelor calciului de tip L (voltaj-dependente).Unele antiepileptice, unele antiaritmice, amiloridul (un diuretic) blochează canale ale sodiului..

Mecanismele transportoare specifice sunt o altă modalitate, care asigură trecerea prin membrane a ionilor şi altor molecule. Din această categorie fac parte *pompele ionice*, care funcţionează specific pentru anumiţi ioni, transportându-i cu consum de energie împotriva gradientului de concentraţie. Pompa de sodiu / potasiu şi pompa de calciu sunt ATP-aze specifice sensibile la ionii respectivi, care menţin concentraţia fiziologică a acestora. Glicozidele cardiace, de exemplu modifică funcţia acestor pompe la nivelul miocardului. Pompa protonică asigură secreţia ionilor de hidrogen de către celulele parietale din mucoasa gastrică, respectiv formarea acidului clorhidric. Omeprazolul blochează această pompă şi împiedică secreţia acidă.

Acțiunile medicamentelor la nivelul unor organite celulare

Anumite molecule endogene şi medicamente îşi datoresc efectele acțiunii la nivelul *nucleului celular*. Astfel glucocorticoizii, steroizii sexuali, vitamina D acționează asupra unor receptori nucleari, funcționând ca factori de transcripție. Unele anticanceroase îşi datoresc citotoxicitatea afectării directe a ADN sau împiedicării sintezei *de novo* a acestora.

Ribozomii, sediu al sintezei proteice, pot suferi influențe medicamentoase. Anumite antibiotice, de exemplu, interferează funcția ribozomilor bacterieni.

Formațiunile veziculare sau granulare de depozit din anumite celule (cele din terminațiile presinaptice, care conțin neurotransmițători, cele din mastocit, macrofage, bazofile, care conțin anumite autacoide) pot fi influențate medicamentos. Astfel, efedrina şi amfetamina eliberează noradrenalina din terminațiile adrenergice, având efecte simpatomimetice, guanetidina împiedică eliberarea noradrenalinei, provocând bloc presinaptic, toxina botulinică paralizează terminațiile colinergice, deoarece împiedică eliberarea acetilcolinei. Cromoglicatul disodic şi ketotifenul împiedică degranularea mastocitelor, cu consecințe antialergice.

Acțiunea medicamentelor la nivelul unor sisteme de reglare

Medicamentele îşi pot datora efectul modificării contolului nervos, umoral sau hormonal a funcției structurii efectoare.

Sinapsa ca loc de acțiune a medicamentelor

Sinapsele sunt deosebit de sensibile la influențe chimice, datorită existenței *neurotransmițătorilor*. Toate etapele dispoziției biochimice şi fiziologice a neurotransmițătorilor sunt susceptibile la influențe medicamentoase: sinteza neurotransmițătorilor, depozitarea acestora în *formațiuni veziculare* sau *granulare presinaptice*, *eliberarea în fanta sinaptică* de către impulsul nervos, acționarea receptorilor specifici situați îndeosebi postsinaptic, inactivarea neurotransmițătorilor prin metabolizare şi/sau captare tisulară. Acțiunile medicamentoase sunt specifice, în funcție de neurotransmițătorii respectivi.

Se pot da numeroase exemple de medicamente a căror efecte se datoresc interferării dispoziției neurotransmițătorilor. Astel levodopa favorizează sinteza dopaminei în sistemul nervos central, ceea ce este avantajos în Parkinson, boală caracterizată prin deficit de dopamină în anumite formațiuni din creier. Medicamente stimulante ale terminațiilor adrenergice, de felul efedrinei, eliberează noradrenalina, după cum guanetidina împiedică eliberarea acestui neurotransmițător; consecutiv prima creşte presiunea arterială, pe când cea de a doua o scade. Multe medicamente acționează sau blochează receptori specifici ai neurotransmițătorilor. Pilocarpina şi alte parasimpatomimetice stimulează receptorii colinergici muscarinici, iar atropina şi celelalte parasimpatolitice îi blochează. Salbutamolul este un stimulant beta$_2$-adrenergic, pe când propanololul blochează receptorii beta-adrenergici. Suxametoniul este un curarizant agonist la nivelul receptorilor colinergici nicotinici de pe placa motorie, iar tubocurarina blochează aceşti receptori. Neurolepticele îşi datoresc efectele nervos centrale blocării unor receptori ai dopaminei sau ai serotoninei în creier. Benzodiazepinele au proprietăți tranchilizante ca urmare a facilitării acțiunii GABA

asupra receptorilor $GABA_A$. Unele antidepresive acționează prin împiedicarea recaptării noradrenalinei şi serotoninei în anumite sinapse din creier, după cum alte antidepresive acționează prin blocarea MAO, respectiv împiedicarea inactivării metabolice a acestor neurotransmițători în sinapsele centrale.

Acțiunile la nivelul sistemelor autacoizilor

Autacoizii sunt *substanțe tisulare active local*, care intervin în variate fenomene fiziologice şi fiziopatologice. În această categorie pot fi încadrate: *histamina, serotonina, bradikinina*, *angiotensina II, prostaglandinele, leucotrienele, oxidul nitric şi endotelina*.Parte din autacoizi au de asemenea funcție de neurotransmițători, unii au, pe lângă acțiunile locale şi acțiuni la distanță.

O serie de medicamente au acțiuni asemănătoare celor produse de autacoizi sau acționează antagonist. Câteva exemple sunt: antihistaminicele antialergice şi cele inhibitoare ale secreției gastrice, inhibitorii enzimei de conversie, care împiedică formarea angiotensinei II, având efect antihipertensiv, unele prostaglandine şi anologi ai acestora folosiți ca antiulceroase, vasodilatatoare. Antiinflamatoarele nesteroidiene îşi datoresc în mare parte efectele dorite terapeutic, ca şi reacțiile adverse, împiedicării sintezei prostaglandinelor.

Acțiunile medicamentelor la nivelul controlului hormonal

Hormonii sunt substanțe endogene secretate de glandele endocrine, care acționează la distanță, reglând funcțiile anumitor celule şi contribuind la integrarea lor în complexul organismului întreg.

Efectele hormonilor se datoresc acționării unor receptori specifici la nivelul celulelor țintă. Insulina, de exemplu, acționează receptori-enzime cu funcție proteinkinazică, adrenalina acționează receptori cuplați cu proteine G, glucocorticoizii şi steroizii sexuali acționează receptori nucleari, funcționând ca factori de transcripție.

Hormonii folosiți ca medicament pot fi indicați ca *medicație de substituție*, de exemplu insulina în diabet sau levotiroxina în insuficiența tiroidiană. Anumiți hormoni au *proprietăți farmacologice* distincte, care pot fi utile terapeutic, de exemplu glucocorticoizii au acțiune antiinflamatoare intensă, de asemenea inhibă procesele imune.

O serie de compuşi semisintetici sau sintetici, mai mult sau mai puțin înrudiți cu hormonii naturali, sunt folosiți în locul acestora, cu anumite avantaje (exemple sunt glucocorticoizii sau progestativele de sinteză). Alți compuşi se comportă antagonist, fiind indicați pentru tratamentul hiperfuncției unor glande endocrine, de exemplu antitiroidienele de sinteză sau diferiți antagonişti ai hormonilor sexuali.

Acțiunile medicamentelor asupra aparatelor efectoare

Funcția aparatelor efectoare poate fi influențată medicamentos prin modificarea contolului vegetativ şi umoral-hormonal al acestora şi prin acțiune directă asupra celulelor componente - celule musculare, celule glandulare.

Bronhodilatația, de exemplu, care este utilă la astmatici, poate fi produsă prin stimulante $beta_2$-adrenergice, prin anticolinergice, ca şi prin bronhodilatatoare musculotrope de felul

teofilinei. Secreția gastrică de acid clorhidric poate fi inhibată prin antihistaminice blocante ale receptorilor protonilor, prin anticolinergice şi prin omeprazol, care acționează direct asupra celulelor parietale, blocând pompa protonică responsabilă de secreția ionilor de hidrogen.

Efectele medicamentelor asupra organismului ca un întreg

Efectele globale ale medicametelor evidențiate asupra organismului în ansamblu sunt rezultanta acțiunii primare şi a tuturor reacțiilor şi contrareacțiilor, care urmează acesteia. Intervin reglări de tip retroaferent, fenomene compensatorii, reflexe şi reacții umorale-hormonale, care imprimă o mare complexitate manifestărilor integrate ale organismului.

O serie de variabile care țin de individ - factori fizici, factori fiziopatologici, variabilitatea biologică – şi de medicament, pot influența efectele farmacologice.

Factori fiziologici, fiziopatologici şi medicamentoşi care pot influența efectele farmacologice

Greutatea şi dimensiunea corporală sunt factori care influențează concentrația medicamentului la locul de acțiune.Pentru aceasta, în cazul anumitor medicamente şi mai ales la copii, doza se calculează în funcție de greutatea sau de suprafața corporală. Trebuie avut în vedere că la persoanele foarte slabe şi pentru obezi intervin deosebiri mari privind volumul lichidian, ceea ce impune corectarea dozei. La cei slabi volumul lichidian reprezintă circa 70% din greutate, la obezi circa 50%, de aceea concentrațiile realizate de medicamente sunt mai mici la primii şi mai mari la ultimii; corespunzător la subponderali dozele trebuie să fie mai mari decât la supraponderali. Excepție fac substanțele care se acumulează în țesutul adipos, de exemplu anestezicele generale, pentru care dozele trebuie să fie mai mari la obezi.

Vârsta exercită influențe de ordin cantitativ, legate de diferențe în greutatea corporală, care sunt relevante la copii. Intervin, de asemenea, influențe calitative, determinate îndeosebi de procesele de epurare a medicamentelor, în parte deficitare la copii mici şi la vârstnici. Există şi o reactivitate diferită a copiilor şi bătrânilor la anumite medicamente.

Starea funcțională poate modifica reacția la medicamente. În general, cu cât un sistem funcționează mai intens, cu atât efectul substanțelor care îl deprimă este mai puternic, relaxantele musculare de exemplu sunt mai active când muşchii sunt spastici.Efectele sunt de asemenea mai evidente atunci când se exercită în acelaşi sens cu tendințele fiziologice, de exemplu, hipnoticele sunt mai active seara la culcare, antipireticele atunci când febra tinde să scadă în mod spontan. Disponibilitatea funcțională a sistemului acționat de medicament poate fi determinantă (sulfamidele antidiabetice de exemplu sunt ineficace când pancreasul endocrin este epuizat în diabetul juvenil). *Sarcina* poartă riscul acțiunilor dismorfogene proprii anumitor medicamente, după cum substanțele ocitocite pot provoca avort, naştere prematură sau accidente obstetricale.

Stările patologice condiționează uneori efectul medicamentelor.De exemplu, tonicele cardiace cresc debitul cardiac şi realizează compensarea în condiții de insuficiență cardiacă, diureticele sunt mai active în prezența edemelor, antiaritmicele îşi pot exercita acțiunea numai în prezența aritmiilor. În plus, stările patologice pot modifica efectele medicamentelor, interferând dispoziția lor în organism sau influențând reactivitatea tisulară. De exemplu,

insuficiența renală sau insuficiența hepatică avansată limitează epurarea şi favorizează toxicitatea cumulativă pentru unele medicamente. Hipertiroidienii sunt foarte sensibili la catecolamine (reacții adverse cardiace sunt frecvente), dar răspund slab la digoxină.

Influențe de ordin psihic pot fi deosebit de importante la om. *Efectul placebo* este definit ca efectul de ordin psihic al oricărei substanțe sau procedeu terapeutic, care survine independent sau puțin dependent de efectele farmacologice propriu-zise. Fenomenul se datoreşte sugestiei sau autosugestiei. El este mai semnificativ atunci când se referă la simptome subiective de felul anxietății sau durerii, ca şi la simptome pentru care contolul vegetativ sau hormonal este important, de felul suferinței epigastrice provocată de hipersecreția acidă sau al hipertensiunii arteriale.

Efectul placebo este avantajos în condiții terapeutice şi trebuie cultivat de către medic pentru a întări efectul farmacologic propriu-zis.

Expunerea anterioară la medicamente poate modifica reacția organismului. Tratamentul îndelungat cu anumite substanțe-analgezice morfinice, hipnotice, determină scăderea progresivă a eficacității, dezvoltând starea de *toleranță*. Administrarea repetată la intervale scurte de câteva doze de efedrină dezvoltă *tahifilaxie*, adică o stare de toleranță acută.

Asocierea medicamentelor, uzuală în practica terapeutică, poate determina *interacțiuni semnificative clinic.* Acestea se datoresc unor interferențe de ordin farmacocinetic sau farmacodinamic.

Interacțiunile de ordin farmacocinetic se referă la procesele de absoebție, la distribuția sau la epurarea medicamentelor.

Interacțiunile farmacodinamice se pot exercita la *nivel molecular*.Efectele a două substanțe parasimpatomimetice, de exemplu, sunt *aditive*, deoarece se exercită asupra aceloraşi receptori colinergici muscarinici; două antiinflamatoare nesteroidiene asociate acționează de asemenea aditiv, deoarece ambele inhibă ciclooxigenaza şi împiedică formarea prostaglandinelor, ceea ce reprezintă mecanismul de acțiune comun. Asemenea asociații nu sunt raționale. Pilocarpina şi atropina au *efecte antagonice*, deoarece prima acționează receptorii colinergici muscarinici iar cea de-a doua îi blochează competitiv. Asemenea asociație este de regulă contraindicată, cu excepția situațiilor de intoxicație acută. Alte interacțiuni farmacodinamice se exercită la *nivelul unor sisteme anatomo-fiziologice*. Parasimpatomimeticele şi blocantele beta-adrenergice provoacă bronhoconstricție aditivă, cunoscut fiind faptul că bronşiile sunt inervate colinergic şi relaxate de către catecolamine. Deprimarea centrală provocată de neuroleptice favorizează efectul altor deprimante, anestezice generale, hipnotice, analgezice opioide. Acest ultim tip de interacțiune poartă numele de *potențare*, deoarece efectul global este mai mare decât suma efectelor parțiale.

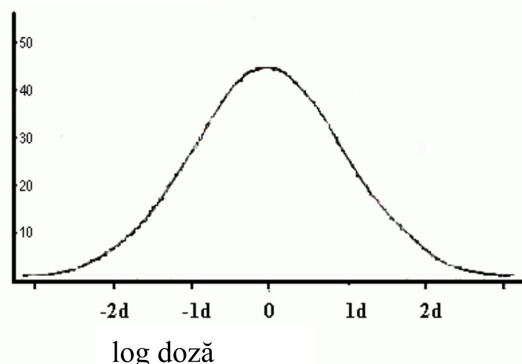
Variabilitatea biologică, relațiile între doză şi frecvența efectului farmacologic într-o populație

Variabilitatea biologică este proprie diferitelor specii sau inter-individuală.In cazul medicamentelor ea se datoreşte profilului farmacocinetic sau reactivității tisulare particulare. Determinismul este genetic.

Variațiile individuale pot fi *exprimate matematic şi reprezentate grafic*. Pentru aceasta se folosesc colectivități la care se înregistrează procentul de indivizi care reacționează printr-un

răspuns cuantal, de tip tot sau nimic, la doze crescânde de medicament. Curba doză / efect exprimă în acest caz *frecvența* (nu *intensitatea*) efectului în populația respectivă. Distribuția normală a frecvenței răspunsurilor individuale în funcție de doză construieşte o curbă simetrică în formă de clopot, curba Gauss. Majoritatea indivizilor din populația studiată sunt îngrămădiți în jurul porțiunii superioare centrale a clopotului, la mijlocul căreia se situează *doza eficace medie-DE50*, respectiv *doza toxică medie* sau *doza letală medie-*DT_{50}*,* DL_{50}. Dispersia în jurul mediei exprimă variabilitatea răspunsului în lotul şi față de substanța respectivă. Curba distribuției frecvenței se poate construi integral pentru fiecare doză, înregistrând sumat procentul de indivizi care răspund la doza respectivă şi la toate dozele mai mici. Se realizează în acest caz o curbă sigmoidă, mai uşor de mânuit, care înregistrează distribuția cumulativă a frecvenței răspunsurilor individuale. Asemenea curbe ilustrează cantitativ eficacitatea terapeutică şi riscul toxic în condițiile folosirii clinice a medicamentelor, administrate în doze diferite la un număr mare de bolnavi, fiecare cu o individualitate proprie. DE50, pentru un medicament, exprimă cantitatea potrivită terapeutică pentru majoritatea persoanelor. Trebuie însă avut în vedere că la extremitățile curbei se găsesc persoane, relativ puține, care sunt mai sensibile, respectiv mai puțin sensibile, necesitând doze ceva mai mici sau ceva mai mari decât cele uzuale.Acesta este un argument puternic pentru importanța observației clinice.Trebuie avut în vedere că parametrii farmacologici au valoarea orientativă, deoarece reprezintă valori medii stabilite în situații standard şi nu valori individuale manifestate în situații particulare.

Frecvență raspuns %



log doză

Curba Gauss a distribuției normale a frecvenței răspunsurilor individuale (d = unitate de deviație standard față de valoarea medie)

Farmacotoxicologia

Farmacotoxicologia are drept obiect studiul efectelor dăunătoare ale medicamentelor.

Intoxicațiile medicamentoase

Supradozarea medicamentelor produce intoxicații acute sau cronice. Toxicitatea se evaluează experimental şi se cuantifică prin stabilirea dozei care intoxică sau ucide 50% din animalele testate, definind astfel DT_{50} , respectiv DL_{50}.

Intoxicațiile acute medicamentoase ocupă un loc important în patologia umană. Printre medicamentele incriminate curent în asemenea intoxicații sunt benzodiazepinele, barbituricele, antidepresivele, neurolepticele şi îndeosebi, diverse asociații medicamentoase, incluzând deprimante ale sistemului nervos central.

Tratamentul intoxicațiilor acute constă în *măsuri nespecifice*, care urmăresc, pe de o parte micşorarea cantității toxice din organism, pe de alta tratamentul simptomatic şi susținerea funcțiilor vitale. Pentru îndepărtarea toxicului, după caz, se fac spălături, se provoacă vomă, se administrează purgative şi /sau diuretice, la nevoie se dace dializa. Tratamentul simptomatic se adresează unor manifestări supărătoare sau dăunătoare - stare de excitație, convulsii, sedare excesivă mergând pănâ la comă, vomă, colici, diaree. *Susținerea funcțiilor vitale, mai ales respirația şi circulația presupune, de regulă*, îngrijirea intensivă într-un serviciu de reanimare. În unele cazuri este posibil şi necesar *tratamentul specific antidotic.* Antidoturile sunt substanțe capabile să combată în mod electiv fenomenele toxice produse de anumite medicamente. Ele acționează fie prin mecanism farmacologic - acțiuni contrarii la nivelul unor sisteme fiziologice sau antagonism competitiv la nivelul unor receptori specifici, fie prin mecanisme chimice, de exemplu inactivarea unor metale toxice prin chelare. Dintre antidoturile mai cunoscute sunt: nalorfina în intoxicația cu morfina şi alte opioide, atropina şi obidoxima în intoxicația cu anticolinesterazice, fitomenadiona în intoxicația cu anticoagulante cumarinice.

Intoxicațiile cronice apar în condițiile administrării repetate de doze mari şi se datoresc acumulării de cantități toxice de medicament.

Reacțiile adverse la medicamente

Reacțiile adverse se definesc ca fenomene nocive, care apar la *dozele uzuale de medicament*. *Frecvența în condiții de spitalizare este în medie de 15%*, dar variațiile sunt foarte mari. Bătrânii, copiii, femeile însărcinate prezintă un risc foarte mare. Principalele simptome se situează, în ordinea descrescândă a frecvenței, la nivelul pielii, tubului digestiv, sistemului nervos central, sângelui aparatului circulator. După mecanismul lor, reacțiile adverse pot fi de tip toxic, de tip idiosincrazic şi de tip alergic.Un loc aparte îl ocupă dependența.

Reacțiile adverse de tip toxic

Reacțiile adverse de tip toxic sunt dependente de doză, apar în condiții de supradozare relativă, frecvența şi intensitatea creşte cu doza.Se manifestă prin tulburări funcționale, eventual leziuni la nivelul unor aparate şi sisteme.

Factorii care fac ca dozele uzuale să provoace fenomene toxice țin de bolnav şi de produsul farmaceutic. Dintre factorii dependenți de bolnavi se pot enumera:

-reactivitatea biologică individuală;

-insuficiența organelor responsabile de epurare (ficat, rinichi) care grefează procesul de inactivare metabolică şi /sau eliminare a unor medicamente;

-anumite stări patologice de organ sau metabolice, care cresc reactivitatea; exemple sunt miocardul bolnav sau hipokaliemia, care favorizează aritmiile.

Alți factori favorizanți ai reacțiilor adverse de tip toxic depind de medicament:

-indicele terapeutic mic, respectiv distanța mică între zona terapeutică şi cea toxică, de exemplu în cazul citostaticelor anticanceroase, antibioticelor aminoglicozidice, digoxinei, adrenalinei;

-biodisponibilitatea variabilă a unor produse farmaceutice, care semnifică inechivalența terapeutică, respectiv posibilitatea eficacității slabe, dar şi riscul crescut de reacții adverse toxice pentru dozele uzuale; preparate de digoxină sau fenitoină de exemplu se pot comporta în acest fel;

-folosirea nejustificată a unor căi de administrare cu risc toxic mare, de exemplu injecțiile, îndeosebi cele intravenoase; este cunoscut riscul mare al injecțiilor intravenoase de adrenalină sau aminofilină;

-schemele de administrare inadecvate , care pot favoriza reacții adverse de tip toxic mai ales în cazul medicamentelor cu potențial cumulativ mare, de exemplu digitalicele;

-anumite interacțiuni medicamentoase sunt semnificative prin riscul mare al reacțiilor adverse de tip toxic; exemple sunt asociația halotan-adrenalină (risc de aritmii severe), asociația anticoagulante cumarinice - acid acetilsalicilic (risc de accidente hemoragice), asociația antiinflamatorii nesteroidiene - glucocorticoizi (risc crescut de lezare a mucoasei gastrice, mergând până la ulcer), asociația tranchilizante - băuturi alcoolice (risc de sedare excesivă).

Tipuri particulare de reacții adverse toxice sunt efectele dismorfogene sau teratogene, efectele mutagene şi efectele cancerigene.

Efectele dismorfogene se manifestă prin defecte morfologice la copii, în cazul administrării medicamentelor la femeile însărcinate. Când defectele sunt majore, având caracter de monstruozitate, efectul se numeşte *teratogen*. O multitudine de factori favorizează efectele dismorfogene şi teratogene. Dintre medicamentele cu risc cert sunt citostaticele anticanceroase, unele antiepileptice (mai ales fenitoina şi trimetadiona), sărurile de litiu, anticoagulantele cumarinice, anumiți derivați de vitamină A, îndeosebi izotretinoina, hormonii sexuali androgeni şi progestativele cu proprietăți androgenice (care pot provoca masculinizarea fătului feminin). Vârsta sarcinii este alt factor major pentru riscul dismorfogen.Sensibilitatea este maximă în primul trimestru de sarcină, mai ales între zilele 20 şi 40, când organogeneza şi determinanții ei chimici sunt la apogeu.

Efectele dismorfogene, respectiv teratogene sunt relativ rare, dar consecințele pot fi dezastruoase. Aceasta impune o serie de măsuri profilactice, printre care:

-evitarea, în măsura posibilului, a medicamentelor în timpul sarcinii, mai ales în primul trimestru;

-dacă se impune folosirea anumitor medicamente în timpul sarcinii, acestea se administrează în dozele cele mai mici eficace;

-incompatibilitatea între sarcină şi medicamente cu risc dismorfogen indispensabile în anumite situații clinice, obligă la evitarea sarcinii (prin mijloace contraceptive) sau la întreruperea acesteia.

Efectele mutagene au drept consecință modificări permanente ale fenotipului, care ulterior, chiar după mai multe generații, pot determina afectarea fenotipului manifestată prin

diferite boli genetice. Exemple de medicamente cu risc mutagen cert sunt: citostaticele anticanceroase şi imunodepresive, unele antiepileptice, unele neuroleptice, metronidazolul, pesticidele organofosforice. Reglementările actuale interzic introducerea în terapeutică a medicamentelor cu risc mutagen, cu excepția celor care sunt indispensabile în anumite situații, de exemplu citostaticele la bolnavii neoplazici.

Există riscul ca unele substanțe să inițieze sau să promoveze dezvoltarea *cancerului*. Uretanul, agenții alchilanți citostatici, DDT-ul sunt exemple de compuşi, care în anumite condiții au proprietăți cancerigene. Substanțele cancerigene sunt de regulă proscrise; atunci când folosirea lor nu poate fi evitată, ele trebuie administrate sub control medical riguros.

Reacțiile adverse idiosincrazice

Reacțiile adverse idiosincrazice sunt independente de doză. Ele diferă calitativ de efectele uzuale ale medicamentelor sau apar la doze obişnuit lipsite de nocivitate. Reacțiile idiosincrazice se datoresc fie modificării unor procese de biotransformare a medicamentelor, fie unei reactivități tisulare neobişnuite. Determinismul este genetic şi se referă la modificări ale sintezei unor proteine specifice, de regulă proteine enzimatice. În stadiul actual sunt relativ puține fenomene idiosincrazice cu substrat genetic şi biochimic elucidat.

Un exemplu de reacție idiosincrazică datorită unei *anomalii de metabolizare* este apneea de tip toxic, care se produce la doze mici de suxametoniu, un ester al colinei cu proprietăți curarizante. Proporția în populație a persoanelor cu asemenea reactivitate este de circa 0,25‰. Fenomenul se explică prin existența unei colinesteraze plasmatice atipice cu capacitate redusă de a hidroliza şi inactiva curarizantul.

Un exemplu de tulburare idiosincrazică datorită unei *reactivități tisulare neobişnuite* este hemoliza, pe care o provoacă la unele persoane dozele obişnuite de primachină, chinină, acid nalidixic, fenacetina şi alte câteva medicamente.

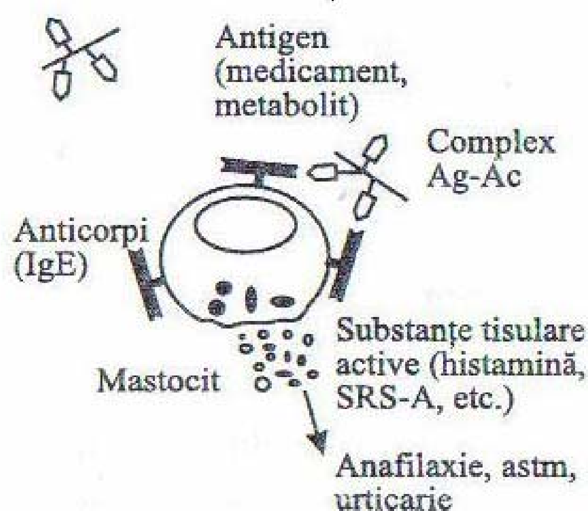
Reacțiile adverse alergice

Reacțiile adverse alergice sunt efecte nocive ale medicamentelor, care au un mecanism imun. Ele sunt independente de doză, pot apărea la doze foarte mici, deoarece presupun o sensibilizare prealabilă. Frecvența generală a reacțiilor alergice la medicamente se situează în jur de 10%. S-a descris o predispoziție, care este probabil determinată genetic.

Sensibilizarea alergică se dezvoltă de obicei după 5-14 zile de la prima administrare, uneori mai mult în cazul tratamentului continuu. Ricul este mai mare pentru administrarea locală şi mai mic pentru administrarea orală. Alergia este specifică la o anumită substanță, dar poate cuprinde şi compuşi înrudiți structural - reacțiile sunt de exemplu comune pentru toate penicilinele. Pentru dezvoltarea alergiei este necesar ca medicamentul, în general cu moleculă mică, să formeze conjugați prin legarea covalentă de o polipeptidă sau proteină din organism. Uneori determinantul antigenic este un metabolit al medicamentului, de exemplu derivați peniciloil pentru peniciline.

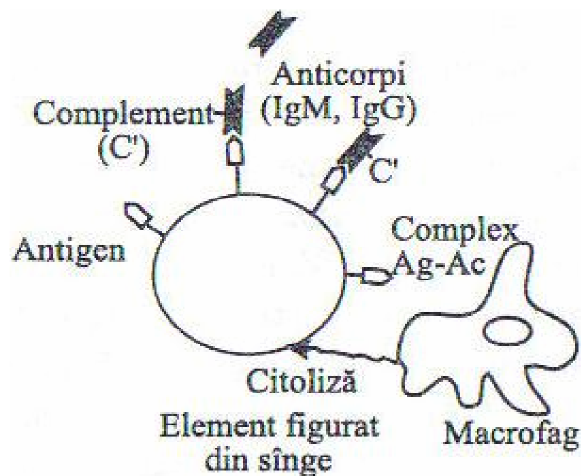
Organismul, odată sensibilizat, este capabil să răspundă prin simptome tipice de alergie la cantități foarte mici de antigen. Există 4 tipuri de reacții alergice, care diferă prin mecanism şi prin manifestările clinice.

Reacțiile alergice de tip anafilactic (tip I) sunt reacții de cuplarea antigenului cu IgE, care acoperă suprafața mastocitelor sau leucocitelor bazofile. Consecutiv sunt eliberați din aceste celule anumiți autacoizi, printre care histamina, prostaglandine, leucotriene, responsabile de efectul alergic. Fenomenele alergice de acest tip au verigi comune cu inflamația. Ele se manifestă prin vasodilatație, eventual hipotensiune, permeabilizare capilară, edeme, bronhospasm. Simptomele caracteristice se încadrează în câteva entități clinice: urticarie, edem angioneurotic, rinită seroasă, astm bronşic; sindromul cel mai acut şi spectaculos este şocul anafilactic, care poate fi letal. Penicilinele şi acidul acetilsalicilic sunt exemple de medicamente cu risc mare de reacții alergice anafilactice.



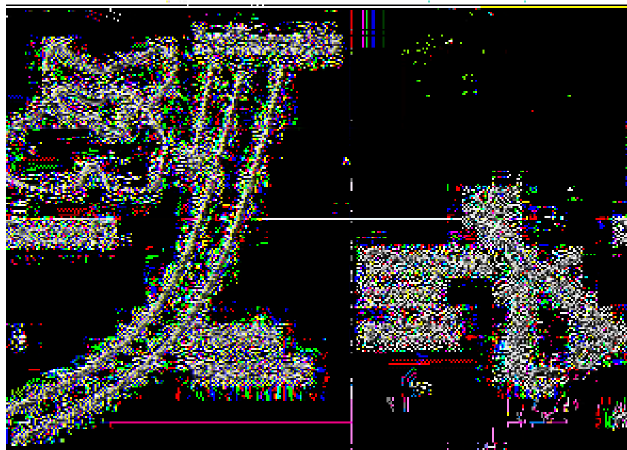
Reacție de tip anafilactic (I)

direcționați specific asupra unor celule purtătoare ale haptenei medicamentoase. Aşa se explică anemiile hemolitice sau trombocitopeniile imune produse de chinină, chinidină, sulfamide, ca şi granulocitopenia la derivații pirazolici de felul aminofenazonei sau la tioamidele antitiroidiene. O categorie particulară a alergiei de tip II sunt *reacțiile citotoxice autoimune*. În cazul reacțiilor autoimune, sub influența unor medicamente se formează antigeni nativi pe suprafața anumitor celule. Exemple sunt anemia hemolitică la metildopa sau sindromul lupoid produs de hidralazine, sulfasalazină, beta-blocante.



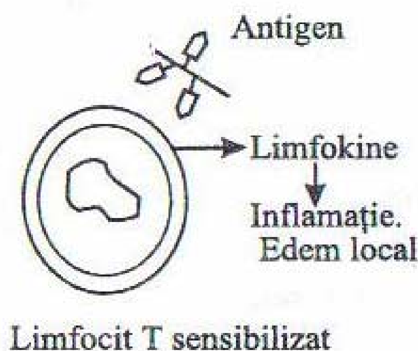
Reacție de tip citotoxic (II)

Reacții alergice prin complexe imune (tip III) se datoresc unor complexe solubile formate de antigen şi anticorpi circulanți (IgG, mai rar IgM). Aceştia se fixează în pereții vaselor mici şi membranele bazale, activând complementul şi generând procese inflamatorii. Manifestările clinice mai frecvente sunt boala serului şi edemul Quinke, vascularitele, pneumonia cu precipitine. Printre medicamentele incriminate sunt penicilinele şi sulfamidele. O modalitate particulară de manifestare a vascularitei prin complexe imune sunt reacțiile cutanate grave de felul eritemului polimorf, sindromului Stevens-Johnson sau sindromul Lyell, care survin rareori în cursul tratamentului cu peniciline, barbiturice, fenilbutazonă, fenitoină.



Reacție prin complexe imune (III)

Reacțiile alergice întârziate, mediate celular (tip IV), se datoresc limfocitelor sensibilizate, care eliberează limfokine generatoare de infiltrate macrocelulare perivenulare. Exemple sunt dermatita de contact la unele antibiotice sau fotoalergia medicamentoasă.



Reacţie de tip celular sau întârziat (IV)

Principalul mijloc de profilaxie a alergiei medicamentoase este anamneza. Utilitatea testelor cutanate şi a unor teste de laborator este limitată. Evitarea sensibilizării alergice presupune, în primul rând, folosirea cu mult discernământ a substanţelor cu risc mare şi evitarea aplicării locale a acestora. Când alergia la un medicament este cunoscută se recomandă evitarea acestuia şi a substanţelor înrudite chimic. Dacă apar manifestări alergice medicaţia cauzatoare se întrerupe. În situaţii speciale se poate încerca desensibilizarea specifică. Alergiile medicamentoase se tratează, după caz, cu *antihistaminice*, utile în formele uşoare, moderate ale alergiilor de tip anafilactic, *glucocorticoizii*, utili în toate tipurile de alergie, dar în general rezervaţi manifestărilor severe şi *adrenalina*, care este indispensabilă în şocul anafilactic. În caz de bronhospasm alergic se administrează bronhodilatatoare, cromoglicat sau ketotifen (inhibitori ai degranulării mastocitelor), glucocorticoizi inhalatori, la nevoie glucocorticoizi sistemici.

Dependenţa

Dependenţa medicamentoasă, *adicţia* sau *toxicomania* este o stare de intoxicaţie cronică caracterizată prin necesitatea constrângătoare de folosire a unor substanţe medicamentoase sau toxice. Ea se caracterizează sub forma ei completă, prin patru trăsături definitorii:

-*dependenţa psihică*, adică necesitatea de ordin psihologic de a folosi un anumit medicament sau toxic;

-*toleranţa*, adică diminuarea progresivă a efectului la repetarea administrării, respectiv necesitatea creşterii dozei pentru a obţine efectul scontat;

-*dependenţa fizică*, care constă în necesitatea de a continua folosirea substanţei respective pentru a evita tulburările, uneori grave, care apar la întreruperea administrării şi sunt cunoscute sub denumirea de *sindrom de abstinenţă*;

-*psihotoxicitatea*.

Substanţele capabile să provoace dependenţă au, de cele mai multe ori, acţiuni psihofarmacologice: euforizantă, liniştitoare, stimulantă psihomotorie, halucinogenă. Principalele substanţe cu potenţial de dependenţă sunt: morfina, heroina şi alte opioide,

amfetaminele, cocaina, alcoolul etilic, barbituricele şi alte hipnotice, benzodiazepinele şi alte tranchilizante, canabinoidele (marijuana, haşiş) şi, în măsură mai mică, nicotina (tutunul) şi cafeina (cafeaua).

Dependența psihică este favorizată de beneficiul therapeutic: calmarea durerii, înlăturarea anxietății, de efectele psihice proprii substanței respective şi de fenomenul de condiționare a administrării.O anumită reactivitate individuală determinată genetic, ca şi intervenția unor factori de ordin social pot motiva, de asemenea, dependența. Morfina, heroina, alcoolul, barbituricele, benzodiazepinele, cocaina, amfetamina au potențial mare de dependență psihică; pentru canabinoide, tutun şi cafea potențialul este relativ mic.

Administrarea repetată a unor medicamente sau toxice poate dezvolta toleranța şi dependența fizică. Procesul este favorizat de prezența continuă a unei concentrații mari de substanță activă la nivelul țesuturilor. Fenomenul prezintă specificitate chimică şi /sau farmacodinamică. Toleranța şi dependența sunt încrucişate, pentru diferitele opioide de tip morfinic sau pentru alcool, barbiturice şi în parte pentru benzodiazepinele tranchilizante.

Toleranța apare mai ales pentru efectele centrale cu caracter subiectiv, mai puțin pentru cele periferice. Doza letală este modificată diferit în funcție de categoria de substanțe, creşte mult pentru opioide, este puțin sau total modificată pentru alcool, barbiturice şi benzodiazepine. După oprirea administrării, sensibilitatea normală revine în câteva zile. Ca mecanism, toleranța are obişnuit o semnificație farmacodinamică, se dezvoltă progresiv procese adaptative de sens contrar intervenției medicamentului sau toxicului respectiv. Uneori contribuie şi interferențe de ordin farmacocinetic, îndeosebi creşterea procesului de inactivare metabolică, de exemplu prin autoinducția enzimatică produsă de barbiturice.

Bolnavul care a folosit repetat morfină sau alte opioide asemănătoare, barbiturice, benzodiazepine, băuturi alcoolice, prezintă la întreruperea administrării un sindrom characteristic, sindromul de abstinență, care marchează dependența fizică, obligând la continuarea administrării. Sindromul de abstinență diferă pentru diversele categorii de substanțe capabile de a dezvolta dependență; se descriu de exemplu un sindrom de abstinență propriu opioidelor, altul de tip alcool-barbiturice. Majoritatea simptomelor corespund unor efecte inverse celor produse de medicamentele sau toxicele respective. Aceasta sugerează că în cursul administrării repetate se dezvoltă fenomene adaptative contrare, care ramân fără contrapondere la întreruperea administrării. Sindromul de abstinență este mai grav în cazul substanțelor cu acțiune intensă şi de durată relativ scurtă, cum sunt morfina sau heroina. Antagoniştii specifici, de exemplu naloxona în cazul morfinei, administrați la persoanele dependente declanşează repede un sindrom de abstinență sever, datorită împiedicării acțiunii caracteristice a drogului respectiv.

Dintre substanțele cu potențial mare de toleranță şi dependență fizică sunt morfina, barbituricele, benzodiazepinele şi alcoolul; potențialul este mic pentru amfetamine, canabinoide, tutun şi cafea.

Psihotoxicitatea, cea de a patra caracteristică a dependenței, se manifestă prin tulburari de comportament, uneori cu caracter psihotic. Acestea apar în condițiile folosirii îndelungate şi abuzive de doze mari de barbiturice şi alcool, amfetamine, cocaină.

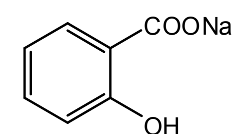
Tratamentul dependenței este foarte dificil datorită întrepătrunderii celor trei factori etiopatogenici: medicament psihotrop, teren psihic, condiții sociale favorizante. Sunt necesare, în primul rând, măsuri profilactice: acțiuni educative, folosirea judicioasă a medicamentelor cu risc, reglementări riguroase privind asemenea substanțe (cunoscute în legislația noastră sub denumirea de „stupefiante"). Tratamentul curativ se face în condiții de spitalizare, sub supraveghere. Pot fi utile, după caz: medicamente psihotrope, care înlătură fenomenele psihice favorizante ale dependenței, substanțe care atenuează sindromul de dependență (de exemplu metadona pentru morfină sau heroină), substanțe care provoacă aversiune (cum este disulfiramul în cazul intoxicației alcoolice).

Analgezice-antipiretice, antiinflamatoare nesteroidiene

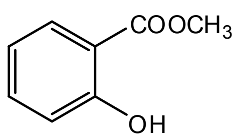
Derivații acidului salicilic

Structura chimică

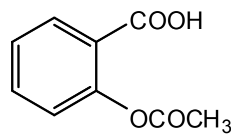
În terapeutică se utilizează: salicilatul de sodiu, salicilatul de metil (Saliform), acidul acetilsalicilic (Aspirina), salicilamida (Salizol).



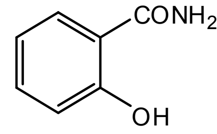
salicilat de sodiu



salicilat de metil



acid acetilsalicilic



salicilamida

Proprietăți fizico-chimice

Salicilatul de sodiu, salicilamida şi acidul acetilsalicilic sunt pulberi albe cristaline, cu gust uşor acid. Salicilatul de sodiu este uşor solubil în apă, acidul acetilsalicilic este greu solubil în apă (1%), dar solubil în solvenți organici. Salicilamida este solubilă în apă la fierbere şi în solvenți organici. Salicilatul de metil este un lichid uleios, incolor, cu miros aromatic, insolubil în apă, solubil în alcool.

Etiologia intoxicațiilor

Intoxicațiile acute au loc cel mai frecvent cu aspirină. Întrebuințarea îndelungată şi abuzivă a derivaților salicilici poate genera fenomene de intoxicație cronică.

Intoxicațiile voluntare (sinucideri) se produc cu aspirină, cu mare frecvență, în Europa şi America şi cu salicilat de metil în unele regiuni din Africa şi Asia.

Intoxicațiile accidentale propriu-zise, survin la copii, reprezentând până la 15% din intoxicațiile medicamenoase în unele țări şi se produc mai ales cu aspirină efervescentă.

Intoxicațiile terapeutice, au loc prin hipersensibilitate sau prin supradozare. În ultimul caz, accidentul poate fi determinat de: doza masivă, funcția renală afectată (acumulare toxică), predispoziție locală sau generală (ulcer, ciroză hepatică) sau ingerare concomitentă a mai multor preparate cu derivați salicilici. La copil, accidentele terapeutice sunt mai frecvente şi mai grave şi se explică prin particularitățile morfo-funcționale ale rinichiului la copil, care determină o eliminare mai lentă şi mai labilă. Totodată, chiar doze normale de aspirină pot

provoca salicilemii crescute la febrili şi deshidrataţi, din cauza scăderii fluxului sanguin şi a pH-ului urinar, cu încetinirea eliminării renale.

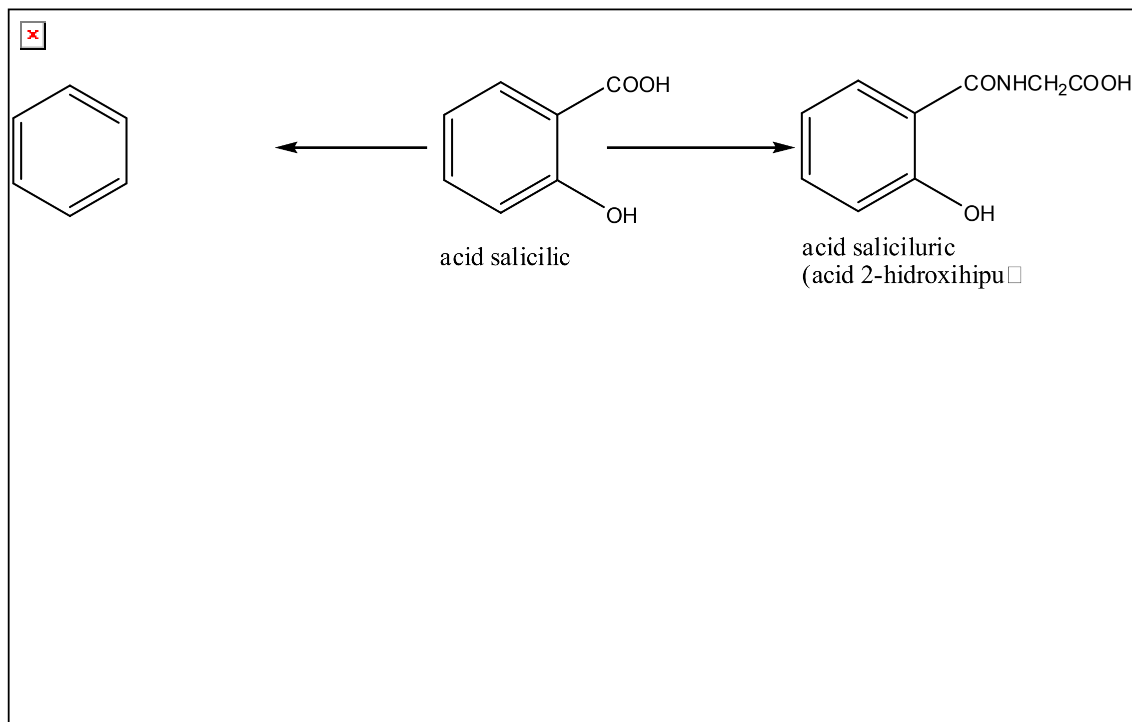
Pătrundere, distribuţie, metabolizare, depozitare, eliminare

Derivaţii salicilici sunt absorbiţi pe toate căile. Pe cale digestivă, absorbţia are loc în stomac şi în primul segment din intestinul subţire, când salicilaţii se găsesc sub formă neionizată, liposolubilă, putând străbate membranele celulare. În intestin, salicilaţii sunt ionizaţi la pH alcalin, iar reabsorbţia este împiedicată. În acest mod se explică frecvenţa redusă a eroziunilor mucoasei intestinale, precum şi mai buna tolerare a aspirinei tamponate.

În sânge, ionul salicilat circulă sub formă liberă şi sub formă legată de proteinele plasmatice, ambele forme fiind în echilibru dinamic.

După absorbţie, ionul salicilat este distribuit rapid în toate ţesuturile şi lichidele organismului, traversând şi bariera placentară. Hidroliza derivaţilor salicilici, cu excepţia salicilamidei care nu suferă hidroliză, are loc în plasmă şi ficat. Ionul salicilic este responsabil de majoritatea acţiunilor farmacologice, totuşi unele efecte ale aspirinei se datoresc capacităţii sale de a acetila proteinele.

Acidul salicilic se metabolizează prin: conjugare la COOH cu acidul glucuronic şi cu glicocolul şi la OH cu acidul glucuronic şi într-o mai mică măsură, oxidare la nucleu cu formare de acid gentizic.



acid gentizuric

Salicilamida este conjugată cu acidul glucuronic şi în mici cantităţi oxidată la nucleu, similar acidului salicilic.

Eliminarea renală este relativ lentă şi are loc prin filtrare glomerulară şi reabsorbţie tubulară a ionului salicilat şi prin secreţie tubulară a derivaţilor conjugaţi. Eliminarea este

favorizată de alcalinizarea urinei datorită reducerii reabsorbției tubulare; alcalinizarea, are şi avantajul creşterii eliminării fracțiunii libere, difuzibile a salicilaților.

Mecanismul de acțiune

Acțiunea antipiretică-analgezică, antiinflamatoare-antireumatică a derivaților salicilici îi recomandă în algii de diferite origini, stări febrile, reumatism articular (acut şi cronic), stări inflamatorii diverse.

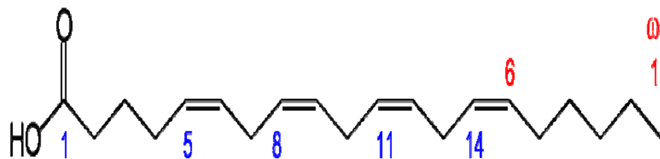
Acțiunea analgezică a medicamentelor de tip aspirină se explică prin deprimarea SNC, cu ridicarea pragului de percepere a durerii, fără a afecta cortexul şi a modifica psihismul, ca analgezicele de tip morfină.

Acțiunea antipiretică se realizează prin influențarea centrului termoregulator, rezultând o pierdere crescută a temperaturii corporale prin vasodilatație cutanată şi stabilindu-se un echilibru între producerea şi pierderea căldurii – echilibru dereglat în stările febrile.

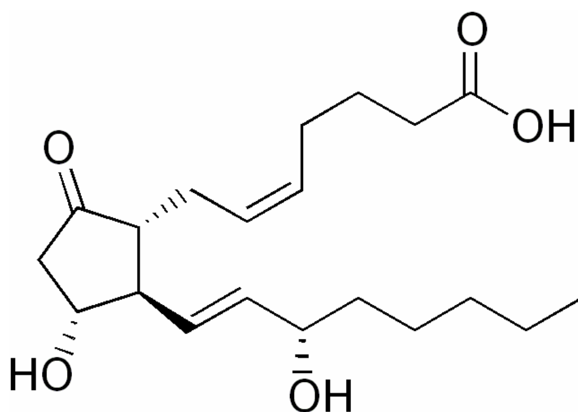
Acțiunea antiinflamatoare, se realizează în mare măsură prin inhibarea prostaglandinelor şi congenerilor acestora; acelaşi mecanism stă la baza capacității de *antiagregant plachetar* al aspirinei datorită căreia este utilizată în tratamentul şi prevenirea bolilor tromboembolice.

a) Prostaglandine, prostacicline, tromboxani

Prostaglandinele (PG) sunt compuşi biologici activi, care conțin un ciclopentan şi provin din acizii polinesaturați cu 3, 4, 5 duble legături şi 20 de atomi de carbon, ca acidul arahidonic.



Acid arahidonic



PGE_2

După natura acidului gras polinesaturat, PG se divid în seriile 1, 2, 3, seria 2 provenind de la acidul arahidonic, precursorul PG cel mai abundent la om. După structura ciclului pentanic, PG se divid în seriile A, B, C, D, E, F numite şi prostaglandine primare.

Acizii graşi polinesaturați rezultă prin scindarea fosfolipidelor din membranele celulare sub acțiunea fosfolipazei A_2 activată de hormoni vasoactivi ca kinina. Prostaglandinele s formează prin conversia acestor acizi graşi polinesaturați, cu apariția intermediară a endoperoxizilor ciclici (-OOH în C_{15}) sub acțiunea ciclooxigenazei (prostaglandin – sintetazei).

Capacitatea țesuturilor de a converti acizii graşi nesaturați în PG variază între 1% şi 75%, dar ciclooxigenaza (PG – sintetaza) este prezentă în toate țesuturile.

Prostaglandinele nu sunt depozitate în țesuturi, ci sunt eliberate imediat după sintetizare, ca răspuns la diferiți stimuli.

Degradarea enzimatică a PG se realizează rapid prin patru modalități, cea mai importantă fiind oxidarea la cetonă în C_{15} sub acțiunea prostaglandin-15 hidroxi-dehidrogenazei (PGDH), cu formare de compuşi cu slabă activitate biologică.

Printre inhibitorii sintezei PG se înscriu şi agenții antiinflamatori nesteroizici de tip aspirină. Ei inhibă eliberarea PG din diverse țesuturi, ca urmare a blocării sintezei prin inhibarea ciclooxigenazei (PG – sintetazei).

Proprietatea de a inhiba această enzimă este oarecum specifică agenților antiinflamatori de tip aspirină, deoarece enzima nu este inhibată nici de corticoizii puternic antiinflamatori, nici de iyomeri ai acidului salicilic lipsiți de efect terapeutic. Inhibiția determinată de aspirină†este de tip competitiv – ireversibil, în interreacția cu centrul catalitic al enzimei intrând în prima etapă gruparea acetil, iar în etapa următoare, salicilatul eliberat prin metabolizarea aspirinei.

b) Acțiunea antiinflatatoare

Se consideră că eritemul edemul, durerea, febra din procesele inflamatorii provocate de diverşi agenți sunt, cel puțin în parte, consecința acțiunii unor PG tisulare eliberate în regiunea afectată.

Eritemul se produce prin relaxarea musculaturii netede a arteriolelor şi venulelor şi a pătrunderii elementelor snguine în spațiul interstițial.

Edemul este rezultatul contracției celulelor endoteliale venulare, cu creşterea permeabilității vasculare.

Durerea se datoreşte sensibilizării regiunii inflamate la acțiunea algezică a unor substanțe endogene ca bradikinina şi histamina.

Faptul că unele PG, ca de exemplu PGE_1, sunt puternic pirogene, explică parțial febra asociată procesului inflamator.

În afară de acțiunea asupra biosintezei PG, mecanismul antiinfamator al derivaților salicilici în boala reumatismală implică şi acțiuni asupra altor procese celulare şi imunologice în țesutul mezenchimal şi conjunctiv, cum ar fi de pildă, afectarea, de către salicilați, a compoziție, biosintezei şi metabolismului mucopolizaharidelor.

c) Acțiunea de antiagregant plachetar

În țesutul vascular, este elaborată, plecând de la acidul arahidonic, o substanță care inhibă aglutinarea plachetelor, dezagregă plachetele deja aglutinate şi dilată vasele sanguine. Această substanță a fost numită prostaciclină (PGI_2). După formarea sa în peretele vascular, PGI_2 difuzează în circulație şi contribuie la activitatea antiaglutinantă a sângelui.

Tromboxanul A_2, descoperit în trombocite, este un puternic aglutinant plachetar, fiind aşadar antagonist PGI_2, care este antiaglutinantă.

Aspirina, prin inhibarea PG – sintetazei şi deci suprimarea formării endoperoxizilor ciclici, determină, odată cu inhibarea sintezei PG şi inhibarea sintezei celorlalţi produşi rezultaţi din endoperoxizii ciclici: PGI_2 şi TxA_2. Deoarece inhibarea PG – sintetazei este ireversibilă, efectul inhibitor durează întreaga viaţă a plachetelor.

Efectul de lungă durată al aspirinei asupra PG – sintetazei plachetare are importante aplicaţii terapeutice, în prevenirea şi tratarea complicaţiilor aterosclerozei.

În prevenirea trombozei, este eficace asocierea aspirină – dipiridamol. Ambele medicamente cresc cantitatea de AMP ciclic (adenozin 3'5' – monofosfat) în plachete, determinând scăderea agregării plachetare, însă prin mecanisme diferite: aspirina inhibă formarea TxA_2 în plachete, facilitând efectele PGI_2 circulante asupra creşterii AMP ciclic; dipiridamolul inhibă fosfodiesteraza, care degradează AMP ciclic, deci împiedică scăderea AMP ciclic. Utilizarea aspirinei este însă complicată de faptul că aceasta inhibă, pe lângă formarea PG şi formarea PGI_2 în vasele sanguine. Ciclooxigenaza din peretele vascular este însă mai puţin sensibilă la acţiunea inhibitoare a aspirinei decât ciclooxigenaza plachetară, astfel încât doza de aspirină este decisivă: doze slabe (100mg/zi) sunt suficiente pentru a împiedica formarea TxA_2 de către plachete, fără a afecta formarea PGI_2 în ţesutul vascular şi probabil în plămâni. Adaosul de dipiridamol la dozele slabe de aspirină permite menţinerea AMP ciclic plachetar la nivel ridicat, datorat PGI_2 .

Proprietăţi toxicologice

Doza toxică de derivaţi salicilici prezintă mari variaţii individuale. Doze de 3 g/zi pot determina fenomene toxice, în timp ce doze de 10 g/zi pot fi bine suportate. Doza toxică este considerată 15 – 20 g aspirină la adult şi 0,15 g/kg la copil. Doza letală de aspirină este apreciată la 20 – 30 g, dar se citează cazuri care au supravieţuit după ingerarea a 60 g şi chiar 130 g aspirină. Salicilatul de metil este cel mai toxic dintre derivaţii salicilici: 4 ml (4,7 g) pot determina moartea unui copil.

Printre reacţiile adverse se înscriu manifestările:

- digestive: greţuri, vărsături, anorexie, iritaţia mucoasei gastrointestinale cu producerea hemoragiilor digestive prin mecanisme diferite;
- neuropsihice şi neurosenzoriale: euforie, bună dispoziţie, agitaţie psihomotorie, cefalee, tremurături, datorate excitării cortexului şi a centrilor subcorticali, prin efect direct determinat de concentrarea salicilatului în celula nervoasă şi prin efect indirect, urmare a epuizării rezervelor de glucoză din ţesutul cerebral: hipoacuzie, zgomote în urechi, datorate congestiei şi hemoragiei la nivelul aparatului cochlear şi a timpanului; reducerea câmpului vizual, viziune colorată, consecinţele vasoconstricţiei vaselor retiniene;
- alergice: erupţii cutanate, edeme, febră, în general benigne. La un număr restrâns de persoane, pot apărea, la câteva minute după ingerarea unei singure pastile de aspirină, fenomene de intoleranţă (hipersensibilitate) ca rinită cu secreţie apoasă abundentă, edem angioneurotic, urticarie, hipotensiune, colaps vasomotor.

Alte reacţii adverse constau în perturbare de:

- Metabolisme: interferarea în metabolismul energetic cu decuplarea fosforilării oxidative şi scăderea sintezei compuşilor macroergici (ATP) cu multiple consecințe, ca: alterarea permeabilității membranare dependentă de cantitatea de energie; scăderea sintezei glutaminei, glicogenului care necesită ATP; creşterea compensatorie a glicolizei aerobe, a cărei energie oxidativă, transformată în energie calorică, se pierde prin tegumente. Derivații salicilici perturbă şi metabolismul glucidic, prin scăderea cantității de glicogen hepatic şi muscular; inhibarea neoglucogenezei hepatice şi creşterea folosirii glucozei în țesuturile periferice, determină hipoglicemie.

- Coagulare: scăderea hemostazei plachetare, prin inhibarea PG – sintetazei, determină interzicerea aspirinei şi medicamentelor similare la pacienții cu afecțiuni hepatice grave, hipoprotrombinemie, deficiență în vitamina K, hmofilie, deoarece pot rezulta hemoragii. Din acelaşi motiv, tratamentul cu aspirină trebuie oprit cu o săptămână înaintea unei intervenții chirurgicale. De asemenea, trebuie ținut seama de faptul că utilizarea aspirinei în timpul tratamentelor de lungă durată cu anticoagulanți orali poate declanşa sângerări ale mucoasei gastrointestinale.

Simptomatologie

Intoxicația acută cu aspirină şi salicilat de sodiu se manifestă prin:

- Tulburări digestive: vărsături, arsuri epigastrice, diaree, melenă;
- Modificarea echilibrului acido – bazic: în faza inițială a intoxicației, salicilatul stimulează centrii respiratori bulbari, determinând hiperventilație şi polipnee cu alcaloză respiratorie prin eliminare crescută de CO_2, la care se adaugă alcaloză metabolică provocată de vărsături. Pentru compensarea alcalozei, rinichiul elimină mari cantități de bicarbonați de sodiu şi potasiu. În intoxicația gravă, salicilatul deprimă centrii respiratori bulbari, provocând hiperventilație cu acidoză respiratorie prin retenție de CO_2, la care se adaugă acidoză metabolică determinată de acumularea de acizi organici (datorită inhibării dehidrogenazelor din ciclul Krebs) şi de acizi fosforici şi sulfuric (datorită insuficienței renale). Ionul solicitat nu contribuie prin el însuşi la acidoză, deoarece concentrația sa ionică este slabă chiar la doze toxice. În cazul salicilatului de metil, metanolul eliberat prin hidroliză nu contribuie la agravarea acidozei, deoarece este în cantitate mică. În schimb, prin blocarea oxidărilor celulare de către metanol, apărarea organismului împotriva acidozei din intoxicația salicilică este scăzută.
- Tulburări hidroelectrolitice (evidențiate prin ionogramă) : deshidratare extracelulară (pierdere de apă prin hiperventilație, hipersudorație, eliminare renală crescută) ; hipernatriemie; hipopotasemie (prin eliminarea K^+ în urină sub formă de bicarbonați şi prin scăderea reabsorbției sale, datorită alterării renale).
- Tulburări vegetative: vasodilatație cutanată cu transpirații şi hipertermie;
- Tulburări neurosenzitive: cefalee, amețeli, surditate trecătoare, scăderea acuității vizuale, fotofobie, agitație, delir, uneori halucinații vizuale şi auditive, comă cu midriază sau mioză.

Pot apărea complicații: insuficiență renală acută, edem pulmonar acut, hemoragii digestive. Moartea poate surveni prin colaps cardiovascular.

Intoxicația cu salicilat de metil, survenită în special la copii, nu diferă mult de intoxicația cu aspirină. Caracteristice sunt tulburările nervoase, hiperpneea, hiperpirexia.

În intoxicația cu acid salicilic, predomină manifestările digestive, datorate acțiunii iritante locale a acidului salicilic.

Tratament

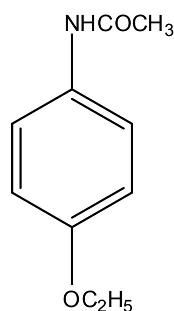
- spălătură gastrică cu suspensie de cărbune sau, după unii autori, cu soluție de bicarbonat, urmate de purgativ salin;
- diureză osmotică alcalinizantă (cu bicarbonat de sodiu), aplicată precoce sub controlul pH-ului sanguin şi cu corectarea hipopotasemiei şi hipocalcemiei;
- corectarea dezechilibrului hidroelectrolitic;
- combaterea hipertermiei şi a convulsiilor;
- tratament cu vitamina K_1.

Derivați de anilină

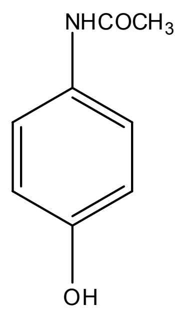
Substanțele care conțin un nucleu benzenic au, în principiu, activitate antipiretică. Deosebit de activă este anilina însă toxicitatea sa, conferită de grupa NH_2, o exclude din terapeutică. Acetanilida (antifebrina), C_6H_5-$NHCOCH_3$, cel mai vechi analgezic-antipiretic (1886) a fost de asemenea abandonată din cauza toxicității.

Structura chimică

Derivații de anilină analgezici-antipiretici sunt fenacetina (acetofenetidina) şi paracetamolul (acetaminofenul).



fenacetina



paracetamol

Proprietăți fizico-chimice

Fenacetina şi paracetamolul sunt pulberi albe, cristaline, inodore, insipide sau cu gust uşor amar (paracetamolul). Sunt puțin solubile în apă, solubile în alcool şi cloroform.

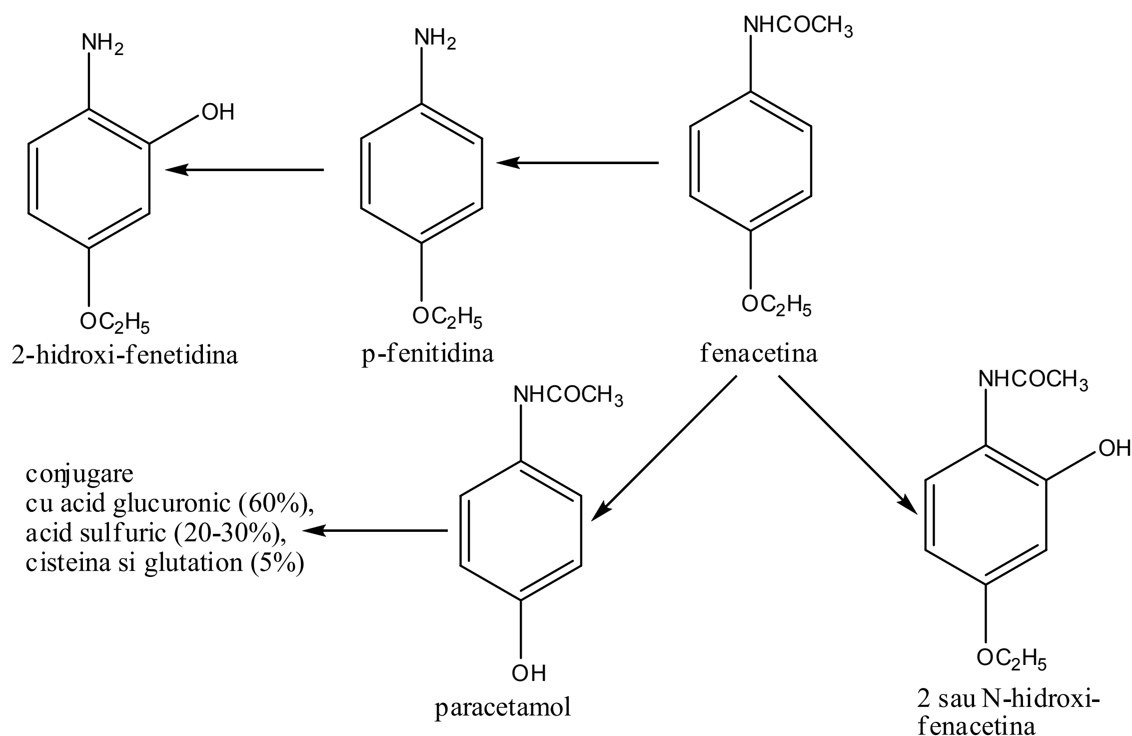
Etiologia intoxicațiilor

Intoxicația acută se datorează absorbției masive în scop de sinucidere sau prin confuzie. Intoxicația cronică este urmarea absorbției zilnice şi îndelungate a produsului sau a formelor sale medicamentoase.

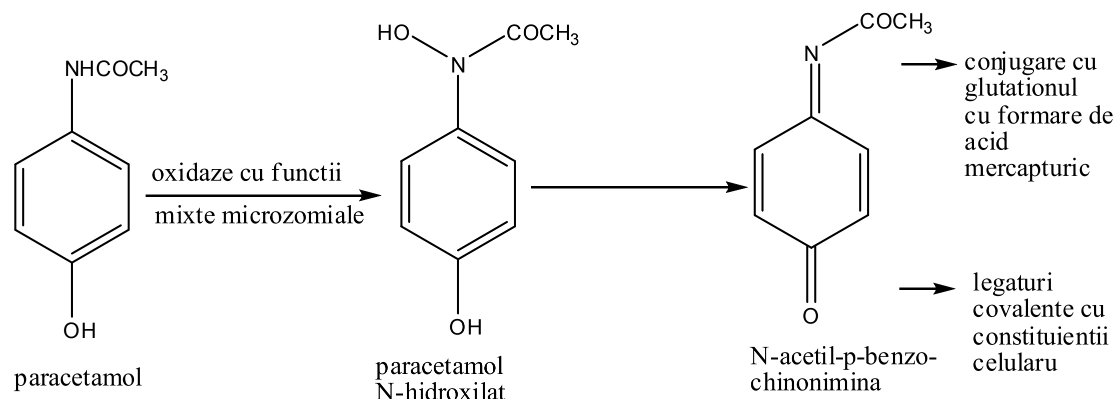
Pătrundere, distribuție, metabolizare, depozitare şi eliminare

Derivații de anilină sunt absorbiți rapid şi complet din tractul gastrointestinal, apoi distribuiți uniform în toate țesuturile.

Fenacetina este metabolizată prin dezetilare la paracetamol şi mai puțin, prin dezacetilare, urmată de 2-hidroxilare la p-fenetidină, respectiv 2-hidroxifenetidină şi de asemenea, prin hidroxilare la nucleu, cu formare de hidroxifenacetină. Toți metaboliții sunt conjugați cu acid glucuronic sau sulfuric.



Conjugarea paracetamolului cu glutationul este cantitativ neînsemnată, însă asigură inactivarea intermediarului reactiv, toxic, de tip chinonimină, produs prin N-hidroxilare. În doze excesive de paracetamol, are loc depleția rezervelor de glutation, astfel încât intermediarul toxic nu mai este inactivat prin conjugare, ci formează legături covalente cu constituienții hepatocitului, rezultând alterarea acestuia.



Inductorii enzimatici de tip fenobarbital intensifică activitatea oxidazelor cu funcţii mixte microzomiale, crescând procentul de metabolit toxic şi mărind hepatotoxicitatea paracetamolului.

Proprietăţi toxicologice. Mecanism de acţiune

Fenacetina este analgezic, antipiretic şi sedativ, iar paracetamolul are acţiune antipiretică superioară fenacetinei. Paracetamolul este antiinflamator, dar numai în doze superioare celor necesare pentru analgezice. Acţiunea antiinflamatorie redusă, lipsa de iritare gastrică şi neinfluenţarea timpului de sângerare corespund cu slaba capacitate de a inhiba prostaglandinele.

Reacţiile adverse mai frecvente sunt următoarele:

-Alergice*:* erupţii cutanate, hipertermie, în general benigne şi trecătoare, cu excepţia dermatitei exfoliative; subiecţii hipersensibili la salicilaţi manifestă alergie şi la derivaţii de anilină;

-Neuropsihice: euforie, impresie de ameliorare a oboselii şi a cefaleei, fapt pentru care reparatele cu fenacetină sunt adesea ingerate fără o indicaţie terapeutică expresă şi care constituie un pericol prin mascarea surmenajului renal;

-***Renale***: tratamentul îndelungat (reumatism) poate determina „nefropatia prin abuz de analgezice”. Leziunea primară este o necroză papilară urmată de nefrită cronică interstiţială;

-Methemoglobinizante şi hemolitice: fenacetina determină apariţia methemoglobinei (MetHb), sulfhemoglobinei, cianozei, anemiei hemolitice numai la doze mari. În administrare cronică, nu apar astfel de manifestări deoarece MetHb nu se cumulează, ci trece în hemoglobină prin mecanismele normale ale organismului. Întrucât o doză unică de 2 g fenacetină la adult transformă numai 1-3% din Hb totală în MetHb, methemoglobinemie determinată de doze terapeutice de fenacetină sau paracetamol nu se exprimă clinic. În intoxicaţia acută sau în abuzul cronic, methemoglobinemia poate contribui la toxicitatea generală.

-Hepatice: după o doză unică de 10-15 g de paracetamol (25 g este doza letală), apare necroză centrolobulară urmată de fibroză, dar fără ciroză; cauza este metabolitul reactiv care, în cazul depăşirii capacităţii de conjugare cu grupări –SH formează legături covalente cu constituenţii hepatocitului. Fenacetina nu este hepatotoxică, deşi principalul său metabolit este paracetamolul, deoarece cantitatea acestuia nu depăşeşte capacitatea de inactivare a sistemelor de conjugare. Acest mecanism de producere a hepatotoxicităţii a determinat cercetări pentru găsirea unui antidot în intoxicaţia cu paracetamol şi s-a ajuns la concluzia că:

-cisteamina (β-mercaptoetilamina) previne instalarea leziunilor hepatocelulare dacă este aplicată în doze adecvate şi destul de curând după intoxicaţie (10 ore). Cisteamina ar acţiona prin inhibarea oxidării microzomiale - deci oprirea formării metabolitului toxic -,prin detoxicarea metabolitului nociv datorită grupărilor sale –SH libere sau ca precursor al glutationului. Cisteamina nu este însă lipsită de oarecare toxicitate;

-*N- acetilcisteina* este mai eficace şi mai puţin toxică decât cisteamina. Acţiunea sa se bazează pe hidroliza rapidă la cisteină. Trebuie însă ca administrarea să fie precoce (în

primele 16 ore de la intoxicație), iar în cursul tratamentului să nu se administreze adsorbanți (cărbune activ) şi purgativ, deoarece aceştia inactivează antidotul.

Simptomatologie

Deşi paracetamolul este principalul metabolit al fenacetinei, manifestările din intoxocațiile cu cele două medicamente sunt diferite.

Intoxicația acută cu *fenacetină* se caracterizează prin tulburări:
-nervoase: amețeli, vâjâituri în urechi, hipotermie, somnolență, comă profundă;
-circulatorii: hipotensiune, puls mic, tahicardie;
-methemoglobinizante şi hemolitice: cianoză, modificări sanguine.
Nefropatia fenacetinică apare numai în intoxicația cronică, după tratament îndelungat cu o cantitate totală de peste 5-6 kg fenacetină.

Intoxicația acută cu *paracetamol* se desfăşoară în trei etape:
-în prima etapă apar grețuri, vărsături, transpirații, stare de rău general, somnolență;
-în etapa a doua (24-36 ore de la ingerare), fenomenele din prima etapă dispar;
-în etapa a treia (36-48 ore), se instalează hepatita toxică (hepatomegalie, dureri, icter), urmate de forme grave de comă hepatică şi moarte; în cazuri rare apare insuficiența renală şi insuficiență miocardică.

Tratament

În intoxicația acută cu *fenacetină*, se realizează:
-spălătură gastrică cu suspensie de cărbune activat, urmată de purgativ; diureză osmotică forțată;
-tratarea methemoglobinemiei, hipotermiei, hipoxiei, şocului.
În intoxicația cu *paracetamol,* se recurge la:
-spălătură gastrică (cât mai precoce) cu suspensie de cărbune activat sau colestiramină; eventual, unul dintre antidoturile recent experimentate (N-acetilcisteină, cisteamină);
-tratament simptomatic.

Toxicologie analitică

<u>Izolare</u>

Fenacetina se izolează din mediu uşor acid sau alcalin iar paracetamolul din mediu acid, cu solvenți organici.
Izolare din urină, sânge:
-se acidulează la pH 5-6 cu acid acetic 5%, 20 ml urină (2 ml ser) şi se extrag de două ori cu câte 50 ml eter (cloroform). Extractele organice reunite sunt repartizate în trei capsule şi evaporate la sec pe B.M. Reziduul dintr-o capsulă este tratat cu 2 ml HCl 20% şi hidrolizat pe B.M. la fierbere, apoi se adaugă 10 ml apă şi se filtrează.

<u>Identificare</u>

Reacții de culoare:

a) Reacția cu H_2SO_4 şi acetaldehidă: reziduul din capsulă este tratat cu 1 ml H_2SO_4 şi 4-5 picături acetaldehidă, când apare o culoare roşie.

b) Reacția indofenolului: la 2 ml filtrat, se adaugă o picătură de fenol 1% şi 2-3 picături soluție de hipobromit, când apare o culoare roşie-închis, care în mediul alcalin trece în albastru.

c) Reacția de diazotare şi cuplare: la 2 ml filtrat se adaugă 0,5 ml HCl 10%, 0,1 ml $NaNO_2$ 1%, se agită, se lasă în repaus 10 minute, se adaugă 2 ml uree 10%, se agită şi după 10 minute, se adaugă 0,2 ml NED 0,1%, când apare o culoare violetă.

d) Reacția cu $FeCl_3$: 10 ml urină se tratează cu 1 ml $FeCl_3$ 1% (proaspăt preparată), când se obține o culoare roşie virând în brun.

Dozare

Metoda colorimetrică (reacția indofenolului):

Principiu: după hidroliză acidă, din fenacetină şi metabolitul său urinar N-acetilparaaminofenol, rezultă paraaminofenol, care în prezența fenolului şi a hipobromitului formează indofenol:

Reactivi:

1) HCl 4 N;
2) NaOH 0,2 N;
3) Fenol soluție apoasă 1% proaspăt preparată;
4) Soluție apoasă de hipobromit de sodiu: se amestecă 3 ml apă de brom saturată cu 20 ml soluție Na_2CO_3;
5) Soluție etalon: se cântăresc 0,1 g fenacetină şi se aduc cu apă la 200 ml (1 ml=0,5 mg).

Modul de lucru: într-o eprubetă gradată se iau 1 ml urină, 1 ml apă distilată şi 4 ml HCl 4 N. Se fierbe pe B.M. la 100^0C timp de 45 minute. Se răceşte şi se aduce la 10 ml cu apă distilată. Din această soluție-hidrolizat de urină- se ia 1 ml, se adaugă 8 ml NaOH 0,2 N, 1 ml fenol 1% şi 1 ml soluție hipobromit. Se lasă la întuneric 30 minute, apoi se citeşte extincția în cuvă de 1 cm la λ=630 nm față de o probă oarbă. În condiții identice se execută o scară etalon cu concentrații cuprinse între 100-500 µg/probă (0,2-1 ml soluție etalon completat la 1 ml cu apă distilată).

Studii clinice şi toxicologice

Epidemiologie

Incidența intoxicațiilor în populația generală este dificil de estimat datorită următoarelor cauze: majoritatea intoxicațiilor se produc la domiciliu, gravitatea lor nu impune întotdeauna

prezentarea şi internarea într-o secție specializată, manifestările clinice sunt atribuite altor boli sau sunt dificil de diferențiat de alte afecțiuni prezente la acelaşi pacient. Intoxicațiile reprezintă 5-10 % din cauzele internărilor în secțiile de terapie intensivă.

Căile de pătrundere a toxicelor în organism sunt: ingestie (75-80%), percutan, ocular, inhalator (fiecare cu aproximativ 5%), parenteral (sub 1%). Cazurile acute reprezintă 90% din totalul intoxicațiilor, cele accidentale fiind prezente în aceeaşi proporție.

Medicamentele sunt implicate în aproximativ 55% din intoxicațiile acute severe la adult şi în 50% din cele pediatrice grave. Intoxicațiile accidentale medicamentoase sunt rezultatul autoadministrării şi autodozării neinformate a medicamentelor, erorilor în prescrierea acestora de către medic, în dozarea lor de către asistente, părinți, vârstnici, în prepararea şi eliberarea medicamentelor de către farmacişti. Cele mai frecvente cauze de intoxicații intenționate sunt consumul abuziv de alcool sau droguri şi tentativele de suicid. La adult, cel mai frecvent sunt incriminate (în ordine descrescătoare a frecvenței) în cazurile acute grave asocierile polimedicamentoase, etanolul, drogurile de abuz, anxioliticele, monoxidul de carbon, asocierea alcool-medicamente, barbituricele, compuşii organofosforici, benzodiazepinele, ciupercile necomestibile şi antidepresivele, iar la copil substanțele caustice, benzodiazepinele, distonocalmul, etanolul, antidepresivele triciclice, barbituricele, derivații de petrol, ciupercile necomestibile, drogurile de abuz, paracetamolul. Intoxicațiile copilului diferă de cele ale adolescentului şi adultului prin: caracterul mai frecvent accidental, depistarea mai precoce, toxicitatea mai mare la copil a aceleiaşi substanțe, cantitățile ingerate de obicei mai mici, lipsa frecventă a condițiilor patologice supraadăugate, răspuns favorabil la tratament şi capacitate de recuperare mai mare. Mortalitatea este semnificativ mai mică la copii (0,5-2 %) față de adulți (aproximativ 5%). Medicamentele care determină cel mai frecvent mortalitate în intoxicațiile acute sunt: analgezicele, antidepresivele, agenții cardiovasculari, sedative/hipnotice/antipsihotice, anticonvulsivantele, antiastmaticele, antihistaminicele, medicamentele conținând fier (mai ales la copii).

Studii toxicologice

Intoxicațiile acute reprezintă la ora actuală o veritabilă problemă de sănătate datorită indicilor de morbiditate şi mortalitate în continuă creştere peste tot în lume. În SUA, în 2004, intoxicația medicamentoasă a reprezentat a doua cauză după accidentele de trafic. În Franța, după autori diferiți, s-a constatat că mortalitatea imputabilă unui accident terapeutic poate varia de la 1% la 14%, punându-se problema caracterului evitabil al evenimentului. Evaluarea reală este extrem de dificilă datorită metodologiilor specifice ş a sistemelor de înregistrare a maladiilor care diferă în funcție de zona geografică.

Includerea medicamentului între cauzele etiologice devine tot mai pregnantă deoarece există două traiectorii distincte de abordare: 1) efectele imputabile direct agentului farmacoterapic; 2) elementele secundare modului de utilizare a substanței medicamentoase.

În fața unei intoxicații asistarea victimei presupune următorii paşi:
a) stabilirea diagnosticului; b) evaluarea gravității; c) instituirea terapiei complexe simptomatice, evacuatorii / decontaminante, antidotice; d) determinarea necesității măsurilor preventive.

Pentru a putea afirma diagnosticul de intoxicație sunt necesare datele anamnestice coroborate cu tabloul clinic, investigațiile de laborator, inclusiv analiza toxicologică, iar în unele cazuri diverse teste diagnostice şi terapeutice. Ideal ar fi ca toate aceste elemente să fie în concordanță cu toxicul / medicamentul şi cu doza ingerată.

O etapă esențială o constituie anamneza cu interogatoriul minuțios al anturajului sau pacientului, care trebuie să raspundă următoarelor întrebări:

1) Ce? (care substanță, una sau mai multe au fost utilizate);
2) Cât? (în ce cantitate o fost luată);
3) Cum? (calea de administrare);
4) Când? (momentul prizei, eventual durata);
5) De ce? (motivul sau rațiunea intoxicației);
6) Ce alte maladii există? (pentru evaluarea riscului co-morbidităților).

Interogatoriu poate fi orientat în funcție de tipul de intoxicație estimat:

-*tentativele suicidare*: reprezintă 90% din intoxicațiile adultului, mai frecvent la femei 60%, iar medicamentele pot fi cauza în 85% din cazuri. Clasele cele mai incriminate de agenți farmacoterapici sunt: benzodiazepinele, neurolepticele, barbituricele, analgezicele, antipireticele, antiinflamatoarele, antiaritmicele de multe ori în combinații diverse şi împreună cu alcoolul etilic;

-*intoxicațiile accidentale domestice*: reprezintă 95% din evenimentele toxice ale copilului

-*toxicomaniile*: prezența contextului, antecedentelor şi stigmatelor specifice

-*erorile terapeutice şi supradozările medicamentoase*: frecvent la extremele de vârstă în prezența unor factori de risc subevaluați şi cu posibilitatea de a rămâne nediagnosticate sau ignorate;

-*intoxicațiile din tentativele criminale*: apanajul organismelor specializate de anchetă în care unitatea medicală este o verigă foarte importantă.

Simptomatologia este, în general, extrem de variată depinzând direct de natura toxicului / medicamentului şi poate afecta toate aparatele şi sistemele organismului uman. Investigațiile biologice, prin anomaliile decelate, pot avea o reală importanță diagnostică permițând suspicionarea unei anumite clase de substanțe, fiind o reflectare directă a efectelor toxice, uneori foarte utile atât în plan evaluativ cât şi terapeutic.

Analiza toxicologică are cert un mare impact diagnostic, prognostic, terapeutic şi medico-legal. Ea trebuie focalizată de clinician pe baza datelor tabloului clinic. În urgență, analiza toxicologică cantitativă este indispensabilă atunci când condiționează strategia terapeutică: administrarea antidotului, a chelatorului, a dozelor repetitive de cărbune activat, instituirea epurării extrarenale (de exemplu: intoxicația cu paracetamol, salicilați, digitalice, fenobarbital, litiu, fier, metanol, etilenglicol, metale). În practică există 4 situații:

a) Intoxicație certă cu substanță cunoscută şi simptomatologie concordantă cu toxicul şi doza;
b) Intoxicație certă cu substanță cunoscută dar cu tablou clinic neconcordant cu toxicul şi doza;
c) Intoxicație sigură după context dar cu toxic necunoscut;
d) Simptomatologie evocatoare pentru o posibilă etiologie toxică în absența contextului şi a altor date.

Evaluarea gravității este o etapă fundamentală pentru că ea determină strategia terapeutică şi de supraveghere. Sunt implicați numeroşi factori: toxicul şi mecanismul său de acțiune, criteriile clinice şi paraclinice, tipul de intoxicație, elemente de vulnerabilitate individuală, asocierea diverselor substanțe (de exemplu, medicamente psihotrope cu etanol) şi prezența co-morbidităților.

Din punct de vedere terapeutic, în mod clasic, există 4 piloni: tratamentul simptomatic, evacuator, epurator şi antidotic. Preluarea unui caz de intoxicație acută comportă cu prioritate aplicarea terapiei simptomatice pentru că se realizează monitorizarea parametrilor vitali, precum şi a bilanțului clinico-biologic inițial cu aplicarea în cazul etiologiilor incerte a testelor diagnostico-terapeutice (de exemplu, glucoză, Flumazenil, Naloxon).
Intoxicațiile medicamentoase reprezintă o problematică extrem de complexă, având implicații multiple de ordin medical, socio-economic şi etico-moral, care datorită extinderii alarmate a cazurilor, necesită o atenție amplificată din partea tuturor celor angajați în actul terapeutic.

Toxicologie analitică

Izolare

Derivații de acid salicilic se izolează din medii acide cu solvenți organici. Salicilatul de metil poate fi antrenat cu vapori de apă.

Identificare

- Reacția de culoare cu clorura ferică

a.) *Urină*: se adaugă la 1 ml urină (eventual diluată 1/5) 5 ml reactiv Trinder, când apare, în câteva secunde, o colorație violetă. Reacția este foarte sensibilă. În condițiile metodei, numai cantități mari de fenotiazine interferă prin apariția unor colorații slabe. Reacția se poate executa şi prin spotare pe o hârtie de filtru umectată cu reactiv Trinder.

Reactivul Trinder: se adaugă 20 g clorură mercurică într-un pahar cu 425 ml apă şi se încălzeşte până la solvire. După răcire se adaugă 20 g nitrat feric $Fe(NO_3)_3 9H_2O$ şi 60 ml HCl N. Clorura mercurică are rolul de a precipita proteinele, care se separă prin centrifugare şi filtrare, încât reactivul poate fi folosit şi pentru sânge.

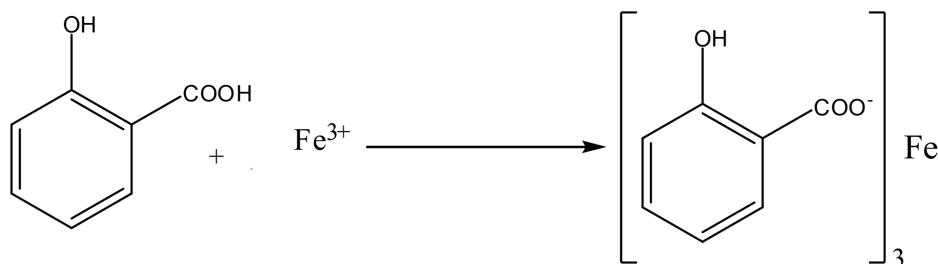
b.) *Sânge, lichid cefalorahidian*: se iau într-un tub de centrifugă 1 ml ser (plasmă, sânge total, lichid cefalorahidian) şi 5 ml reactiv Trinder; se agită un minut şi se centrifughează, când în stratul supernatant apare o colorație violetă.

c.) *Lichid gastric*: în acest caz este necesar, pentru acidul acetilsalicilic, să se hidrolizeze lichidul în mediu alcalin la cald, deoarece altfel reacția este negativă sau numai slab pozitivă. Se iau într-un pahar conic 10 ml lichid gastric, 10 ml apă şi un ml NaOH 40%, se adaugă o bilă de sticlă şi se fierbe pe sită, timp de trei minute. Se răceşte şi se ia 1 ml hidrolizat, se adaugă 4 ml apă şi se ajustează la pH 5 cu HCl 10%. La 1 ml lichid ajustat la pH 5 se adaugă 5 ml reactiv Trinder: o colorație violetă indică prezența acidului acetilsalicilic, atunci când reacția efectuată pe lichid gastric nehidrolizat a fost negativă sau slab pozitivă.

Dozare

- Metoda colorimetrică cu clorură ferică

a.) Principiu: ionul salicilic dă cu ionul feric un complex de culoare violetă, fotometrabil la λ=535 nm;



Reactivi: 1) Reactiv Trinder;

2) Soluție etalon stoc: se cântaresc 0,2320 g salicilat de sodiu şi se aduc la 100 ml cu apă distilată (1 ml=2 mg acid salicilic);

3) Soluție etalon diluată: în momentul întrebuințării se diluează soluția etalon stoc 1/5 (1 ml=400 μg acid salicilic).

Modul de lucru: se ia 1 ml urină (eventual diluată) sau 1 ml ser (plasmă, lichid cefalorahidian), se adaugă 5 ml reactiv Trinder şi se agită puternic. Se centrifughează şi se extrage cu grijă supernatantul. Se citeşte imediat extincția în cuvă de 1 cm la λ=535 față de o probă oarbă. În condiții identice se execută o scară etalon cu cantități între 100 şi 400 μg probă (0,25-1 ml soluție etalon diluată completat la 1 ml cu apă distilată). Se face corecția pentru diluția efectuată, eventual la urină (se diluează astfel încât concentrația finală să se înscrie între 100 şi 400 mg/litru).

Interpretarea rezultatelor:

1) Dozarea salicilemiei este esențială pentru stabilirea diagnosticului şi evaluarea, în oarecare măsură, a gravității intoxicației. Dimpotrivă, saliciluria are valoare limitată, deoarece chiar ingerarea a 1-2 comprimate de aspirină determină o reacție pozitivă cu $FeCl_2$; în schimb, după stabilirea diagnosticului dozările în dinamică în urină permit urmărirea eliminării toxicului.

Tabelul 1

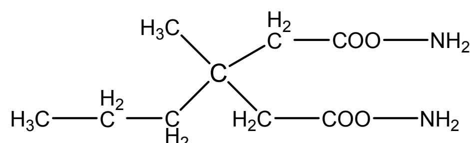
Corelația între salicilemie şi gravitatea intoxicației
(după Meunier, 1972)

Salicilemie (mg/100 ml plasmă)	Manifestare clinică
< 50	Lipsa, în general, a manifestărilor clinice
50-80	Intoxicație uşoară sau medie
80-100	Intoxicație gravă, cu apariția tulburărilor neurologice
100-150	Intoxicație foarte gravă
>150	Intoxicație, de obicei, fatală

2) Ingerarea a 3-5 g acid acetilsalicilic determină, în general, la adult, salicilemii de 25 mg/100 ml plasmă după 4 ore, de 15 mg/100 ml după 12 ore şi de 5 mg/100 ml după 24 ore. Ingerarea a 20 g acid acetilsalicilic determină o salicilemie de 100 mg/100 ml. Saliciluria variază în raport cu diureza şi tratamentul, dar se înscrie de obicei, în intoxicațiile acute, între

1000 şi 4000 mg/litru urină. Se poate stabili, după unii autori, o corelaţie între salicilemie şi gravitatea intoxicaţiei. (tabelul 1)

Determinarea meprobamatului



A. Izolare

Meprobamatului se izolează din soluţie apoasă acidă cu solvenţi organici(eter, diclormetan, cloroform). Se mai poate izola şi din mediu neutru şi alcalin la pH = 10.

a. <u>Izolare din mediu acid cu eter</u>

1. Se acidulează 20 ml urină (lichide gastrice), într-o pâlnie de separare, cu acid clorhidric concentrat până la pH = 4 şi extrage de două ori cu câte 2o ml eter. Extractele eterice reunite sunt spălate cu 20 ml apă distilată, filtrate pe sulfat de sodiu anhidru şi evaporate la sec.

2. Se aplică pentru sânge metoda Griffon Le Bretton (V. Derivaţii barbiturici).

b. <u>Izolarea din mediu acid cu diclormetan sau cloroform</u>

10 ml urină (2 ml ser) se acidulează la pH 4 cu acid clorhidric concentrat şi se extrage într-o pâlnie de separare cu 20.30 ml diclormetan (agitând 10-15 minute). Se separă faza organică, se spală de două ori cu câte 15 ml apă distilată. Faza organică este filtrată pe sulfat de sosiu anhidru şi se evaporă la sec.

c. <u>Izolarea din mediul alcalin cu diclormetan sau cloroform</u>.

10ml urină (2 ml ser) se alcalinizează la pH 10 cu amoniac 10% se extrage de două ori cu câte 20 ml cloroform. Extractele reunite se spală cu 20 ml apă distilată, se filtrează pe sulfat de sodiu anhidru şi se evaporă la sec.

B. <u>Identificare</u>

1. <u>Reacţii de culoare şi fluorescenţă</u>

a. <u>reacţia Nadeau- Sobolewski</u>: se tratează reziduul cu 0,3 ml apă distilată, cu câţiva cristale de hidrochinonă şi 3 ml acid sulfuric concentrat, când apare în maxim 5 minute, prin expunere în lumină U.V. (366nm), o fluorescenţă roz-orange. În cazul extractului din lichidul gastric este obligatorie menţinerea soluţiei timp de 15 minute pe B.M. la100°C.

b. <u>Reacţia cu acid sulfuric</u>: se încălzeşte reziduul pe baia de apă cu acid sulfuric concentrat, timp de 10 minute, când prin expunere în lumina UV (366 nm) se observă o fluorescenţă alb - verzuie, caracteristică.

c. <u>Reacția Hyndrickx</u>: se reia reziduul cu 1,5 ml acetonă, la care se adugă imediat 0,1 ml acid sulfuric concentrat. Se agită cu o baghetă pentru a uşura dizolvarea şi omogenizarea. Se adaugă 0,1 ml furfurol 1% în acetonă (preparat extemporaneu) şi se imprimă capsulei o uşoară mişcare de rotație. Se lasă în repaus câteva minute când apare pe pereții capsulei şi deasupra fazei lichide, un inel discontinuu, intens colorat violet. Nu se iau în considerare inelele verzi, brune sau cenuşii.

d. <u>Identificare din forme farmaceutice</u>: pulverizează comprimatul şi se triturază cu 5 ml alcool. Se filtrează; 2 ml filtrat se evaporă la sec într-o capsulă de sticlă. Se răceşte. Se adaugă 2 ml para-di-meti-benzaldehidă 10% în acid sulfuric concentrat (preparat extemporaneu). Se omogenizează când apare o culoare galbenă. Se menține capsula 3 minute pe baia de apă la fierbere, când apare culoarea virează la roşu. Se răceşte în apă cu gheață şi se adugă cu picătura, 2 ml apă distilată răcită la gheață când culoarea tece în albastru violet.

2. <u>Cromatografie în strat subțire</u>

Faza staționară: silicagel G Merck

Faza mobilă: a. ciclohexan: etanol (8 : 2 v/v)

b. cloroform: metanol (9 : 1 v/v)

c. metanol : amoniac 12 N (9 : 1 v/v)

d. n butanol : amoniac (9 : 1)

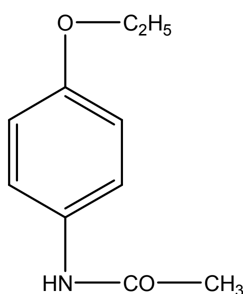
Proba de analizat : reziduul se dizolvă în 0, 2 – 0,5 ml metanol.

Martorul: meprobamat de metanol.

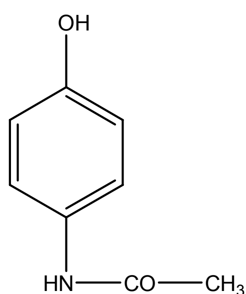
Relevarea: uscarea cromatoplăcii 15 minute la 70°C şi pulverizarea cu furfurol 1% în acetonă (preparată extemporaneu) apoi cu acid sulfuric 4 % în acetonă. Apar spoturi violete, însă reacția este interferată de fenotiazine.

b. Pulverizarea cu hidrochinonă 2% în acid sulfuric concentrat şi uscare 20 – 30 minute 70°C, apoi expunere la UV când apar spoturi fluorescente, roz.

III. 11. Determinarea medicamentelor pe bază de para-aminofenol



Fenacetina



Paracetamolul

A. Izolare

Fenacetina se izolează din mediuu uşor acid sau alcalin, iar paracetamolul din mediu acid , cu solvenţi organici (eter etilic, diclor etan şi cloroform).

1. Izolare din urină şi sânge: se acidulează 20 ml urină (2 ml ser) cu acid acetic 5% la pH 5-6 şi se extrag de două ori cu câte 50 ml cloroform (eter). Extractele organice reunite sunt repartizate în capsule şi evaporate la sec. Reziduul obţinut este tratat cu 2 ml acid clorhidric 20% şi hidrolizat pe baia de apă, la fierbere, timp de 15 minute. se adaugă 10 ml apă şi se filtrează. Identificarea se execută atât reziduu, cât şi pe filtrat sau direct pe urină.

B. Identificare

1. Reacţii de culoare

- Fenacetina

a. Test preliminar: se adaugă la 2 ml urină acidulată cu acid clorhidric 10%, 3 picături nitrat de sodiu 1% şi 3 picături soluţie alfa-naftol 1% în hidroxid de sodiu 10% (preparată proaspăt). În prezenţa paracetamolului- metabolit al fenacetinei – se dezvoltă o culoare roşie.

b. Reacţia cu clorură ferică: se adaugă la 2 ml filtrat o picătură de fenol 1% şi 2-3 picături de hipoclorit de sodiu 5% sau cloramină B 4%, când apare o culoare roşie- violetă, care în mediu alcalin trece în albastru.

d. Reacţia cu acid sulfuric şi acetaldehidă: se tratează reziduul cu 1 ml acid sulfuric concentrat şi 4-5 picături acetaldehidă când se dezvoltă o culoare roşie.

c. Reacţia indofenolului: se adaugă la 2ml filtrat o pictură de fenol 1% şi 2-3 picături de picături de hipoclorit de sodiu 5% sau cloramină B 4%, când apare o culoare roşie-violetă, care în mediu alcalin trece în albastru.

d. Reacţia cu acid sulfuric şi acetaldehidă: se tratează reziduul cu 1 ml acid sulfuric concentrat şi 4-5 picături acetaldehidă când se dezvoltă o culoare roşie.

e. Reacţia de diazotare şi cuplare: se adaugă la 2ml filtrat, 0,5 ml acid clorhidric 10% şi 0,1 ml nitrat de sodiu 1%. Se agită şi se lasă în repaus 10 minute, după care se adaugă 2 ml uree 10%, se agită şi după 10 minute se adaugă 0,2ml N-naftiletilendiamină (NKD) 0,1% când apare oculoare violetă. Reacţia se pretează şi pentru dozare.

f. Reacţia cu bicromat: se tratează 1 ml filtrat cu 2-3 picături bicromat de potasiu 5%, când se dezvoltă o culoare roţi ribinie. În aceleaşi condiţii, acetaldehida dă o culoare galbenă, care virează în verde.

- Paracetamol

a. Reziduul reluat cu 2-3 picături clorură ferică 1% dă o culoare verde-albastră.

b. Reziduul tratat cu acid clorhidric 10% pentru hidroliză acidă, dă la adăugare de bicromat 5% o culoare violet ce nu trece în rubiniu (reacţia de diferenţiere de fenacetineă).

c. Reziduul tratat cu 1-2 picături acid sulfuric concentrat ţi 1-2 picături alcooletilic, degajă la fierbere, un miros specific de acetat de etil.

d. Reziduul tratat cu reactiv Liebermann (0,6 g azotit de potasiu 10 ml acid sulfuric conc.) se obţine o culoare galbenă.

2. Identificarea din corp delict (resturi de medicamente)

Se fierbe 0,1 g substanţă cu 1 ml acid clorhidric concentrat timp de 3 minute. Se diluează la 10 ml cu apă, se răceşte, se filtrează şi se adaugă o picătură bicromat de potasiu 0,1 N. În

prezența fenacetinei apare o culoare violetă, care trece în roşu-rubiniu, iar în prezența paracetamolului, se dezvoltă lent o culoare violetă care nu virează în roşu.

3. <u>Cromatografia în strat subțire (tehnica Bologh)</u>

La 25 ml urină se adaugă 10 g clorură de sodiu (pentru obținerea extragerii) şi se aduce cu hidroxid de sodiu 10% la pH 9. Se extrage de 3 ori cu câte 30 ml eter cu adaus de 1,5% alcoolizoamilic. Fazele eterice se evaporă la sec. Se reia reziduul cu 1 ml etanol. Se spotează 10 µg din soluția etanolică, alături de martori – soluții etenolice de fenacetină, paracetamol, p-fenetidină. Sistemul de migrare folositeste: cloroform : benzen : acetonă (65 : 10 : 25). Revelarea se ealizează prin: expunere 10 minute la vapori de iod, apoi pulverizarea cu iodură de potasiu soluție 10% în amidon, când apare spoturi albastre – violet; pulverizare cu soluție clorură ferică – fericianură de poasiu (3 g : 0,15 g dizolvate în 30 ml apă), când apar spoturi albastre – violet pe fond albastru deschis. Rf-urile sunt: 0,81fenacetină; 0,41 paracetamol; 0,91 p-fenetidină.

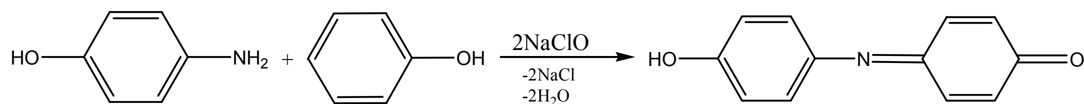
Pentru diferențierea fenacetinei de fenazonă, aminofenazonă, acetanilidă, se foloseşte unsistem de migrare; acetonă : cloroform (1 : 9). Relevarea se realizează prin pulverizarea cu clorură ferică 5% în acetonă; după încălzire uşoară, apar spoturi roşii-violet pe fond galben.

C. <u>Dozarea</u>

<u>Metoda spectrofotometrică</u> (reacția indofenolului)

<u>Principiu</u>:

După hidroliză acidă, din fenacetină şi paracetamol (metabolitul său urinar) rezultă p-aminofenol, care în prezența fenoluluişi a hipocloritului, formează indofenolul de culoare albastră ce se spectrofotometrează la λ = 550 nm în cuva de 1 cm față de martor.



<u>Reactivi</u>:

1. Acid clorhidric 4 N
2. Hidroxid de sodiu 0,2 N
3. Fenol soluție apoasă 1 % (proaspăt preparată)
4. Soluție apoasă de hipoclorit de sodiu (se amestecă 3 ml apă de clor saturată cu 20 ml soluție carbonat de sodiu (2,2 g carbonat de sodiu anhidru la 20 ml apă).
5. Soluție standard: se aduc 0,1 g fenacetină la 200 ml cu apă .

1 ml = 500 µg fenacetină.

<u>Modul de lucru</u>

Într-o eprubetă gradată se iau: 1 ml urină, 1 ml apă şi 4 ml acid clorhidric 4 N. De fierbe pe baia de apă la 100°C timp de 45 minute şi se aduce cu apă la 100 ml. Din această soluție – hidrolizat de urină – se ia 1 ml, se adaugă 8 ml hidroxid de sodiu 0,2N, 1 ml fenol 1% şi 1 ml

hipoclorit. Se lasă la întuneric 30 minute. Se citeşte extincţia la spectrofotometru, la λ = 630 nm, în cuva de 1 cm, faţă de un martor.

Curba de etalonare se întocmeşte între 100 şi 500 µg/probă.

Eprubeta						
Reactivi(ml)	1	2	3	4	5	6(M)
Standard de lucru	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	-
500 µg/fencetină/ml	100	200	300	400	500	-
Apă distilată	0.8	0.6	0.4	0.2	-	1.0
Acid clorhidric 4N	4.0					
Se fierbe 45' pe BM. Se răcesc						
Hidroxid de sodiu 0.2N	1.0-agitare					
Fenol 1%	1.0-agitare					
Hiploclorit de sodiu	1.0-agitare, 30 minute la întuneric					
Extincţia	λ=630nm					

Valoarea extincţiei pentru probă se raportează la curba etalon, apoi se înmulţeşte cu 10 (deoarece s-a lucrat cu 1/10 din probă) obţinându-se concentraţia C a fenacetinei în µg/probă.

<u>Calcul</u>

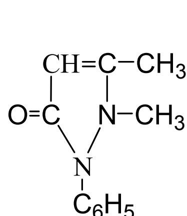
Rezultatele se exprimă în mg fenacetină/litru urină.

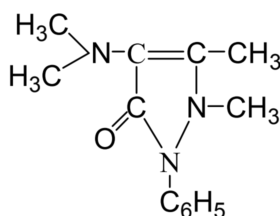
mg fenacetină/litru urină = C

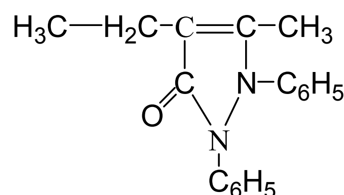
în care:

C = concentraţia fenacetinei, în µg.

Determinarea derivaţilor pirazolonici







Fenazona Aminofenazona Fenilbutazona

A. Izolare:

Fenazona se extrage din produse biologice cu eter etilic sau dicloretan în mediu neutru, slab alcalin şi chiar acid.

Aminofenazona se extrage cu eter etilic sau cloroform în mediu alcalin.

Fenilbutazona se extrage din lichidul apos acid cu cloroform sau hexan.

a. Izolare din urină şi sânge: se alcalinizează 50 ml urină (5 ml plasmă) la pH = 8 cu bicromat de sodiu. Se extrage de două ori cu câte 50 ml cloroform. Extractele cloroformice reunite sunt filtrate pe sulfat de sodiu anhidru, eventual şi pe cărbune activ şi evaporate la sec pe baia de apă. În reziduu se identifică fenazona şi aminofenazona. Pentru fenilbutazonă se procedează idntic, însă de extrage din mediu cu pH uşor acid, cu cloroform pentru urină şi cu hexan pentru sânge.

b. Izolare din organe. se triturează 10 g organe cu 1 g nisip purificat, se adaugă 10 ml apă distilată şi 10 ml acid tungstic 10%. Se încălzeşte 15 minute pe baia de apă, pentru a favoriza precipitarea proteinelor. Se filtrează, se alcalinizează filtratul la pH = 8 cu amoniac concentrat şi se extrage de două ori cu câte 50 ml cloroform. Extractele reunite sunt evaporate pe baia de apă la sec. În reziduu se identifică fenazona şi aminofenazona. Pentru fenilbutazonă se procedează identic, însă se extrage din mediu cu pH uşor acid.

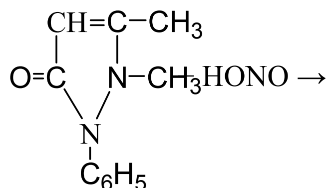
B. Identificare:

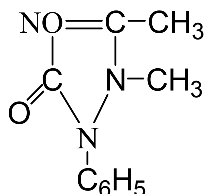
1. Reacţii de culoare:

Fenazona

a. Reacția feripiridinei: se tratează reziduul cu 0,5 ml clorură ferică 10% (proaspăt preparată), când apare o culoare roşie, care se intensifică la încălzire şi dispare la adaus de acid sulfuric. Dacă se adaugă 2-3 picături hidroxid de sodiu 10% se obține o colorație galbenă.

b. Reacția nitrozoantipiridinei: se dizolvă reziduu în 1-2 ml apă, se adaugă 1 ml acid sulfuric 1% şi 2-3 picături azotit de sodiu 1% când apare o culoare verde persistentă, prin formarea nitrozoantipiridinei.



HONO →


c. Se tratează reziduul cu 1-2 picături acid clorhidric 10% şi 1-2 picturi formol 40%, se încălzeşte la fierbere şi după răcire, se alcalinizeazăcu amoniac diluat, când apare un precipitat alb (diferențiere de aminofenazonă).

d. Se tratează reziduul cu 3-4 picături reactiv Mandelin, când apare o colorație verde.

e. Se tratează reziduul cu 10 picături p-dimetilaminobenzaldehidă 10% în acid sulfuric concentrat (reactiv Wasicky), când apare o culoare galbenă care treceîn roşu prin încălzire (reacția este negativă pentru aminofenazonă).

- Aminofenazona

a. Se tratează reziduul cu 1-.2 picături clorură ferică 1% (proaspăt preparată), când apare o culoare violetă trecătoare, care se decolorează în exces de reactiv. Dacă se adaugă 5 picături acid clorhidric 10% soluția se colorează în galben.

b. Se dizolvă reziduul într-un ml apă, se adaugă 0,5 ml azotit de sodiu 5% şi 0,2 ml acid sulfuric 10%, când se dezvoltă o culoare albă violacee, care se decolorează în exces de reactiv.

c. Se tratează reziduul cu 1 ml persulfat de potasiu 1%, când apare o culoare albastră, care trece succesiv în roşu – violet şi galben.

d. Se reia reziduul cu câteva picături acid fosforic d = 1,71 şi se adaugă câteva cristale de clorat de potasiu, când se formează o culoare galbenă-aurie.

e. Se tratează reziduul cu reactiv Schiff, când se obține o culoare violetă.

f. Reziduul tratat cu câteva picături azotat de argint 10% la cald, dezvoltă o culoare violetă, apoi în timp se depune un precipitat cenuşiu de argint metalic.

- Fenilbutazona

a. Se tratează reziduul cu câteva picături reactiv Mandelin, când apare o culoare roşie.

b. Se dizolvă reziduul în 1 ml apă şi se adaugă 1 ml reactiv Follin – Ciolteu, iar după alcalinizare apare o colorație albastră ce se spectrofotometrează la 750 nm.

c. Se fierbe reziduul cu acid fosforic sau acid clorhidric 10%; benzidina formată, prin hidroliză este identificată prin diazotare cu azotit de sodiu 1% şi cuplare cu beta naftol sau N-naftiletilendiamina (NKD). Se obține o culoare roşie cărbunie.

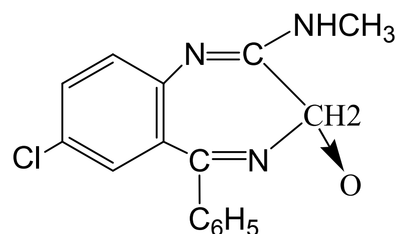
2. Cromatografie pe strat subțire

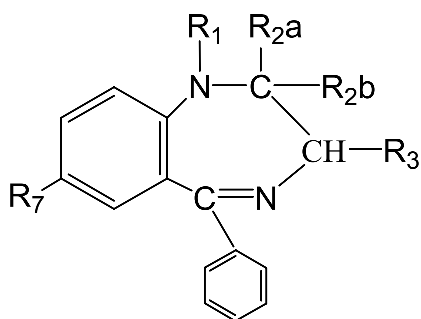
Se dizolvă reziduul în 0,2-0,5 ml etanol sau cloroform şi se spotează pe cromatoplacă în paralel cu martori.

Sistemele de migrare sunt: metanol (etanol) : cloroform (1 : 9) sau acetonă : cloroform (1 : 9) pentru anâminofenoză; cloroform : metanol (9 : 1) sau acetat de etil : metanol : amoniac concentrat (8,5 : 1 : 0,5) pentru fenilbutazonă.

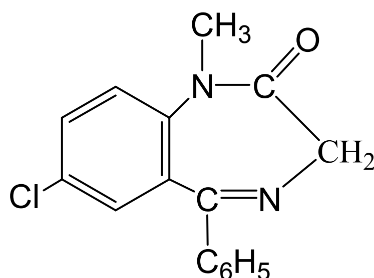
Revelarea se realizează prin: expunere în U.V., pulverizare cu reactiv Drangendorff sau reactiv Bouchardat (pentru aminofenozonă) şi permanganat de potasiu 1% (spoturi galbene pe fond roz) sau fericianură de potasiu 0,5% şi clorură ferică 1% (în volume egale) (spoturi albastre pentru fenil butazonă).

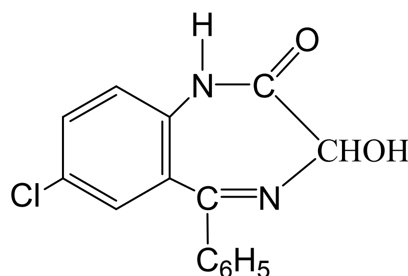
Determinarea benzodiazepinelor





Benzo(f)diazepine 1,4 Clordiazepoxidul





Diazepamul Oxazepamul

A. Izolare :

a. Izolarea clordiazepoxidului şi a benzaldehidelor cu R_1 = alchil

Se aduce 25 ml urină pH = 6,8 – 7,0 cu tampon fosfat şi se extrag de două ori cu câte 50 ml cloroform, agitând câteva minute. Se filtrează extractele cloroformice reunite pe un filtru peste cărbune activ şi se spală filtru cu puţin cloroform. Se evaporă filtratul la sec pe baia de apă la 50 - 60°C.

Se procedează identic pentru 2 ml plasmă, 0,1 ml tampon şi 25 ml cloroform.

Tampnul fosfat: 30 ml hidroxid de sodiu 0,1 N; 50 ml fosfat disodic 0,1 N, apă ad. 100ml.

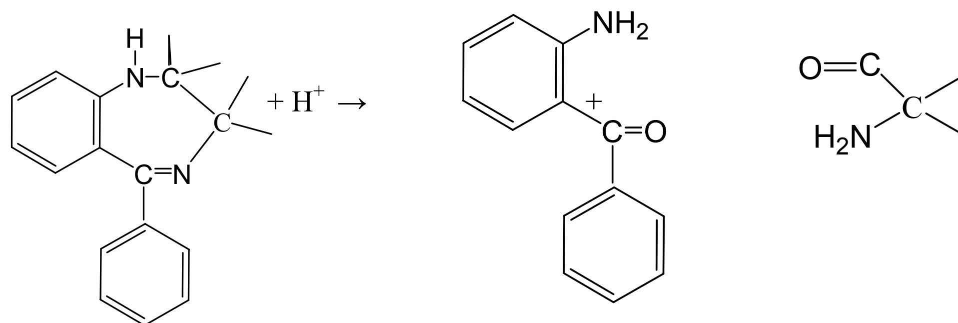
c. Izolare 2- aminobenzofenonei: Se hidrolizează într-un balon prevăzut cu refrigerent ascendent, 25 ml urină cu 10 ml acid clorhidric concentrat, încălzindu-se pe baia de apă la fierbere timp de 30 minute. Se răceşte şi se filtrează(dacă este cazul). Se neutralizează lichidul cu hidroxid de sodiu 30% şi se extrage de două ori cu câte 50 ml eter. Se filtrează extractele reunite pe sulfat de sodiu anhidru şi se evaporă la sec pe baia de apă.

B. Identificare:

1. Reacţii de culoare:

Benzodiazepinele, spre diferenţă de majoritatea medicamentelor, nu pot fi puse în evidenţă, în produsele biologice, printr-o metodă simplă şi directă. Metoda de identificare rapidă este indirectă şi de bazează pe reacţia de diazotare şi cuplare, caracteristică aminelor primare aromatice. Într-adevăr, prin hidroliza acidă la încălzire, clordiazepoxidul şi benzodiazepinele

cu R_1 = H (oxazepamul, clorazepamul, lorazepamul, nitrazepamul) şi metaboliţii lor formează derivaţi ai 2- aminobenzofenonei, extractibili cu solvenţi organici:



Diazotarea nu poate fi aplicată la toate benzodiazepinele ca atare. Astfel:

-bebzodiazepimele cu R_1 = alchil)diazepam, prazepam, flurazepam, metazepam, nimetrazepam, flunitrazepam), fotmează prin hidroliză amine aromatice secundare, nediazotabile. În organism însă, aceste benzodiazepine suferă, parţial, N_1- dezalchilare, astfel încât metaboliţii N_1–dezalchilaţi, prezenţi în urină şi sânge, pot fi identificaţi după hidroliza acidă, prin diazotare şi cuplare. Ele pot fi însă identificate prin această metodă în lichide gastrice şi corpuri delicte (medicamente), deoarece se găsesc în stare nemetabolizată, nediazotabilă;

- metazepamul posedă două grupări metilice între N_1 şi N_4 (având R_{2a}, R_{2b}, şi R_3 = H). Gruparea CH_2 din poziţia 2 măreşte stabilitatea legăturii N_1-C_2, care nu poate fi scindată prin hidroliză acidă (în condiţiile metodei), astfel încât nici metabolitul N- dimetilat nu se scindează cu formare de derivat 2-aminobenzofenolic. În schimb, pintre metaboliţii medazepanului se găseşte şi un compus N-demetilat având în C_2 un alcool secundar, ceea ce labilizează legătura N_1-C_2 şi permite scindarea compusului.

a. <u>Reacţia Bretton- Marshall</u>: 2-aminobenzofenona, având gruparea NH_2 liberă, poate fi diazotată şi cuplată, formând unazoderivat colorat, colorimetrabil. De asemenea, reziduul obţinut prin extragerea directă, hidrolzat prin tratare cu 2 ml acid clorhidric 4 N şi încălzire pe baia de apă la fierbere timp de 15 minute, apoi răcut, dă această reacţie. Se diazoteată reziduul de la izolarea 2-aminobenzofenonei reluat cu 1 ml acid clorhidric 10% sau reziduul de la extracţia directă, prin tratare cu 0,5 ml azotit de sodiu 0,5% şi se ţine la gheaţă. După 15 minute se elimină excesul de nitrit cu 2 ml uree 10% sau 1 ml sulfamat 2,5%. Se agită şi se lasă în repaus 10 minute apoi se daugă 1ml N-naftiletilendiamină (NED) 0,1%, când se obţine o coloraţie roz violacee. Această reacţie nu este dată de diazepamul ca atare, ci numai de metabolitul său N-demetilat.

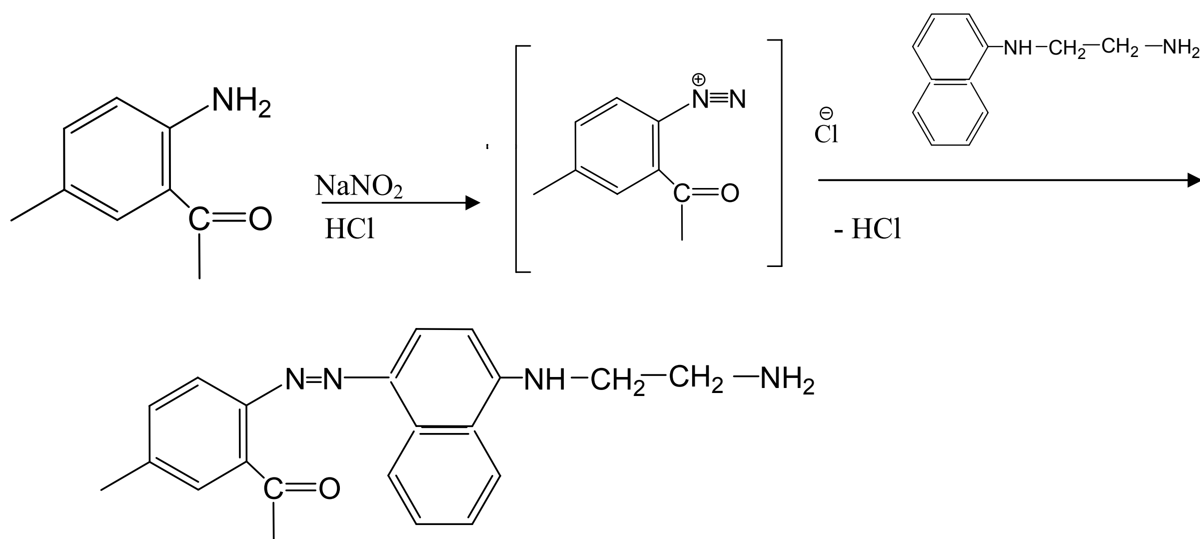
Pe acelaşi principiu se bazează şi reacţia Pelzer (cuplare cu alfa –naftol, când se obţine o coloraţie roz colorimetrabilă la = 492 nm şi reacţia Tréouël (cuplare cu N-alfa-naftil-N_2-dietilpropilendiamină), când se obţine o coloraţie violetă colorimetrabilă la = 540 nm.

b. Reziduul tratat cu molibdat de amoniu dă o coloraţie portocalie.

2.<u>Cromatografie în strat subţire</u>:

Se dizolvă reziduul de la extragerea directă (fără hidroliză acidă în 0,2 ml cloroform şi se spotează pe o cromatoplacă în paralel cu martorii.

Sistemele de migrare sunt: cloroform : metanol : toluen (10 : 1 : 4) şi metanol : acetonă : trietanolamină (1 : 1 : 0,3).
Revelarea se realizează prin pulverizare cu reactiv Drangendorff modificat, când apar spoturi brun-roşcate, atât pentru benzodiazepine, cât şi pentru metaboliţii lor, diferenţiaţi prin Rf.
C. Dozare.
1. Metoda spectrofotometrică Bartton-Marshall
Principiu:
Derivatul 2- aminobenzofenonic rezultat prin hidroliză acidă la cald este diazotat şi cuplat cu N-naftiletilendiamină, cu formarea unui azoderivat roz-violaceu, colorimetrabil.



Reactivi:
1. ACid clorhidric 2N;
2. Azotit de sosiu 0,5%;
3. Uree 10% sau sulfamat de amoniu 2,5%;
4. N-naftiletilendiamină 0,15;
5. Soluţie standard stoc: Se cântăresc 0,20 g clordiazepoxid, se dizolvă în 10 ml apă distilată şi 5 – 10 ml acid clorhidric concentrat. Soluţia se fierbe pe baie de apă 30 minute. Se răceşte şi se aduce la 100ml cu acid clorhidric 2 N (1 ml = 2 mg).
6. Soluţia standard de lucru: Se diluează soluţia standard stoc 1 : 100 cu apă distilată (1 ml = 20 µg).
Modul de lucru:
Se dizolvă reziduul obţinut prin extragere cu solvenţi organici, după hidroliză acidă, în 2 ml acid clorhidric 2 N şi se aduc cantitativ cu apă distilată într-un balon cotat de 25 ml. Se iau 5 ml din această soluţie şi se adaugă 0,5 ml acid clorhidric 2 N şi 0,5 ml nitrit de sodiu 0,5%. Se agită şi se lasă în repaus 5 minute la gheaţă.
Se adaugă 1 ml uree 10% sau sulfamat de amoniu 2.5%; se agită şi după 10 minute se adaugă 1 ml naftl-etilendiamină 0,1%. Se citeşte extincţia la spectrofotometru, λ = 550 nm, în cuvă de 1 cm, faţă de proba martor.

Curba de etalonare se întocmeşte între 4 şi 20 micrograme după schema:

Eprubeta						
Reactivi(ml)	1	2	3	4	5	6(M)
Standard de lucru (20µg ml)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	-
Conc.µg	4	8	12	16	20	-
Apă distilată	2.3	2.1	1.9	1.7	1.5	2.5
$NaNO_2$ 0.5%	0.5ml repaus la gheață					
$H_4NO\text{-}SO_2.NH_2$	1ml repaus 10 minute					
NED 0.1%	1.0ml-agitare					
Λ= 550nm						

Calcul:

Rezultatele se exprimă în mg benzodiazepină/100 ml plasmă sau 1000 ml urină:

mg benzodiazepină/100 ml plasmă = C / A x 10

mg benzodiazepină/ 1000 ml urină= C/ A

C = concentrația benzodiazepinei în µg;

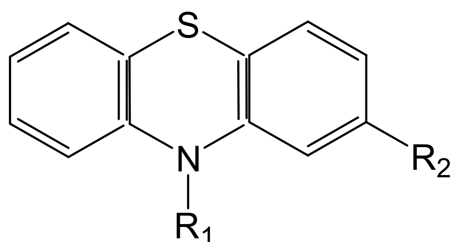
A = volumul de plasmă (urină) luat în lucru, în ml.

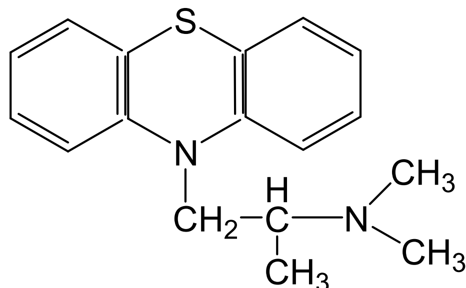
Observații:

Se poate folosi şi reziduul obținut prin extragere directă (fără hidroliză), dacă se tratează cu 10 ml acid clorhidric 4 N , se hidolizează prin încălzire 30 minute pe baia de apă la fierbere şi după răcire, se aduce cantitativ într-un balon cotat de 25 ml cu apă distilată.

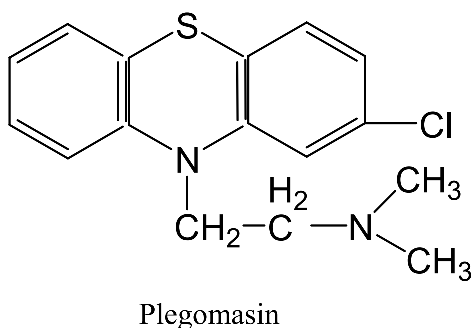
Metoda este interferată de toți metaboliții N-dezalchilați ai benzodiazepinelor.

Determinarea fenotiazinelor

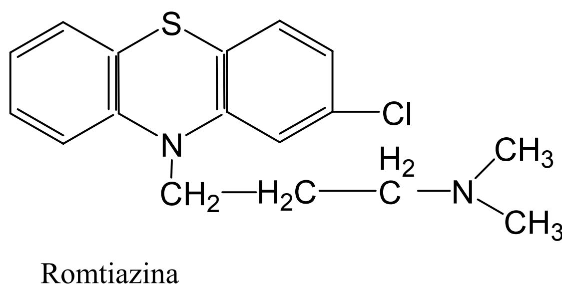




Romergan



Plegomasin



Romtiazina

A. Izolare.

Fenotiazinele se izolează din mediu alcalin şi parțial di mediu acid, cu diclor etan, diclormetan, cloroform, eter, hexan. Metaboliții conjugați se extrag după o prealabilă hidroliză acidă, astfel încât pentru organe şi sânge este preferabil să se execute hidroliza, pentru a regăsi şi produşii conjugați.

a. Izolare din urină, lichide gastrice:

Se iau într-o pâlnie de separare, 50 ml urină (lichid gastrice filtrate) şi se alcalinizeză la pH = 10 cu hidroxid de sodiu 20%. Se adaugă 80 ml dicloretan, diclormetan, sau cloroform şi se agită puternic 3 minute. Se repetă extragerea cu 80 ml solvent. Se spală fazele organice de 2 ori cu câte 20 ml apă distilată, se filtrează pe sulfat de sodiu anhidru şi se evaporă la sec sau se folosesc ca atare.

b. Izolare din sânge:

1. Se tratează 10 ml sânge total cu 10 ml acid tricloracetic 20%, se filtrează, se alcalinizează la pH = 10 cu hidroxid de sodiu 20% şi se extrage de două ori cu câte 50 ml cloroform sau hexan. Se filtrează extactele organice reunite pe filtru uscat şi se evaporă la sec pe baia de apă.

2. Se tratează 5 ml ser cu15 ml apă distilată, 1 ml hidroxid de sodiu 4% şi 25 ml dicloretan. Se agită puternic 10 minute. Se centrifughează şi se elimină, prin aspirare, faza apoasă supernatantă. Se foloseşte în faza organică ca atare sau reziduul.

c. Izolare din organe şi sânge:

Se macerează 10 g ficat cu 10 ml apă şi se adaugă 13,5 ml acid clorhidric concentrat. Se încălzeşte amestecul pe baia de apă timp de 5 minute, apoi se răceşte în gheață. Se adaugă 12 ml hidroxid de potasiu 60% spălat în prealabil cu eter, se agită şi se verifică dacă pH-ul este alcalin. Se răceşte şi se extrage de două ori cu câte 50 ml eter. Extractele eterice reunite se agită cu 15 ml hidroxid de sodiu 2,5%. Se îndepărtează faza apoasă, iar faza eterică se spală de două ori cu câte 10 ml apă. Extractele eterice reunite se evaporă la sec. Se procedează identic pentru 10 ml sânge, 2 ml apă, 8 ml acid clorhidric concentrat.

B. Identificare:

1. Teste orientative (direct pe urină)

a. Testul cu reactivul Forrest "universal" (reactiv FNP): se adaugă la 1ml urină, 1ml reactiv Forrest. Se obțin imediat colorații portocalii, roz, roşii, violete, culoarea depinzând de natura

fenotiazinei, iar intensitatea colorației fiind oarecum proporțională cu concentrația acesteia. Reacția este pozitivă pentru salicilați, PAS, benzodiazepine pigmenți biliari. Reacția poate fi executată şi prin suprapunerea unei picături de reactiv FNP peste o picătură de urină proaspătă pe o hârtie de filtru uscată. Reacția este mai sensibilă dacă se extrag 10 ml urină alcalinizată cu hidroxid de sodiu, cu 20 ml eter, faza eterică evaporată, iar reziduul eteric reluat în 2-3 picături alcool etilic şi spotat pe hârtie, peste care se suprapun 2-3 picături reactiv Forrest (tehnica Noirfalise).

Reactivul Forrest ("universal"): clorură ferică 5%, 5 ml, acid percloric d = 1,67 20% (v/v) 45 ml, acid azotic d = 1,67 50% (v/v), 50 ml.

Testul cu reactivul Forrest este utilzat pentru: depistarea intoxicației cu fenotiazine (un test negativ indică absența absorbanței masive de fenotiazine); urmărirea eliminării fenotiazinelor în timpul spălăturii gastrice; urmărirea eliminării fenotiazinelor în timul spălăturii gastrice; urmărirea eliminării urinare a metaboliților în cursul intoxicației fenoteazinice. Dezavantajul testului Forrest: sunt reacțiile fals negative, când metaboliții fenoteazinici sun în doze mici, diluați, într-un volum mare de urină; reacțiile false pozitive, când urina provine de la persoane care au ingerat salicilați sau PAS, sau când conține mari cantități de pigmenți biliari, esterogeni.

b. Spot-testul cu acid azotic concentrat: se aplică 1-2 picturi de urină peo hârtie de filtru, marcând cu creionul conturul peteu, â. Se usucă şi se suprapune o picătură de acid azotic concentrat, când apar, peconturul creionat, în inele roz, roşii, violete, în raport cu natura fenotiazinei şi cocentația sa. La concentrații foarte scăzute, observarea hârtiei se face prin transparență.

c. Testul cu acid sulfuric şi clorură ferică: se adaugă la 1 ml urină, 1 ml reactiv compus din 80 ml acid sulfuric 10% şi 20 ml clorură ferică 5%, când se obține o colorație roz-mov.

d. Testul pentru tioridazină: se adaugă la 1 ml urină, 1 ml reactiv compus din 98 ml acid sulfuric 30% şi 2 ml clorură ferică 5%, când apare, în prezența tioridazinei, o colorație roz deschis care se intensifică şi trece în albastru.

Toate aceste teste pot fi executate şi pe rezduu sau pe soluția extractivă.

2. Reactii de culoare (pe rezduu sau soluția extractivă).

a. Reacția chinhidronică şi acid fosforic)Reacția Meunier): într-o eprubetă se introduc 15 ml soluție extractivă obținută de la extagerea urinii (v. iuolare, pt. A) şi 5 ml reactiv chinhidronă-acid fosforic. Se agită puternic un minut. Apariția unei colorații de la roşu-portocaliu la violet albastru în faza inferioară acidă indică prezența fenotiazinelor. Colorațiile sunt stabile şi au absorbții maxime cuprinse între 497 şi 638 nm; principlele fenotiazine având următoarele absorbțiimaxime:

Clorpromazina............527 nm	Triproperazina............509 nm
Levomepromazina.......567 nm	Trietiperazina..............636 nm
Alimemazina...............510 nm	Flufenazina..................500 nm
Proclorperazina...........528 nm	Tioridazina...................636 nm
Trifluoperazina............497 nm	Promrtazina............512 nm

Numai în prezența catităților mai mari cloroprotixină, faza acidă inferioară se colorează în portocaliu palid. În acest caz,expunerea soluției acide în lumina U.V. pune în evidență

fluorescența intensă, datorită clorprotixemiei, iar absorbția maximă este la 497 nm, deci în afara zonei de absorbție a fenotiazinelor.
reacția se poate aplica şi pe rezidiuu, care la tratare cu 0,2-0,3 ml reactiv chinhidronă-acid fosforic dezvoltă colorațiile menționate, datorită fenoteazinelor.
Reactiv chinhidronă-acid fosforic: se amestecă extemporaneu 1 ml soluție chinhidronă 0,001 M sau benzoparachinonă 0,001 M în diclor metan şi 4 ml acid ortofosforic d = 1,71. Masa moleculară a chinhidronei = 218g iar benzoparachinonei = 108 g.
b. Reacții de indentificare cu reactivi oxidanți:
Pe hârtia de filtru se pun câteva picături din extractul diclormetanic (cloroformic), se fixează locul petei cu creionul, se lasă să se evapore, se adugă api câteva picături din următorii reactivi (tabelul 9)

Tabelul nr. 9
Reacțiile romerganului şi plegomazinului cu reactivii oxidanți

Culoarea		
Reactivi	Romergan	Plegomazin
Apa de brom 10%	Brun-roșcat-verde	Roz-roșu
Bicromat acetic 1 %	Roz	Roz
Cloramină T 2%	Violet	Violet
Acid percloric	Roșu-vișiniu	Roșu-vișiniu

c. Reacții cu reactivii speciali de culoare ai alcaloizilor:
Reziduul (în funcție de fenotiazina studiată) dă culori de la roz-roşu-violet-albastru cu reactivi speciali de culoare ai alcaloizilor: R. Fröhde, R. Marquis, R. Wasicki.
d. Reacția de diferențiere clorpromazinei de prometazină:
Reziduul tratat cu sulfat mercuric 1% dă o colorație roşie în prezența prometazinei, nu însă în prezența clorpromazinei.
3. Cromatografie pe strat subțire:
Faza staționară (suportul): cromatoplăci de silicagel G Merck, activate timpde o oră la 110°C.
Faza mobilă: (Sistemul de solvenți):
S_1 metanol – amoniac (100 : 1,5 v/v);
S_2 benzen – dioxan – amoniac (60 : 35 : 5 v/v/v)
S_3 acid acetic glacial-etanol-apă (30 : 50 : 20 v/v/v)
S_4 acetat de amoniu-apă-metanol (3 g : 20 : 100 v/v/v)
Proba de analizat: reziduul reluat cu 0,2-0,5 ml cloroform.
Martori: fenotiazine (romergan, plegomazin) dizolvate în cloroform.
Revelare: 1. R.Forrest – spoturi roz-roşu;
2. Reactivul Meunier – spoturi violet;
3. Reactivul Marquis – spoturi roz-roşu.
În tabelul nr. 10 sunt prezentate valorile Rf-urilor pentru câteva fenotiazine:

Tabelul nr.10
Rf-urile fenotiazinelor în diferite sisteme de solvenți

	S_1	S_2	S_3	S_4
Compusul	Rf	Rf	Rf	Rf
Romergan (prometazin)	0.42	0.62	-	0.51
Clorpromazin (Clordelazin)	0.49	0.94	-	0.71
Romtiazin (Promazin)	0.42	0.62	-	0.51
Neuleptil	0.61	-	-	-
Nozinan	0.28	-	-	-
Emetiral (Proclorperazin)	0.45	0.70	0.27	0.55

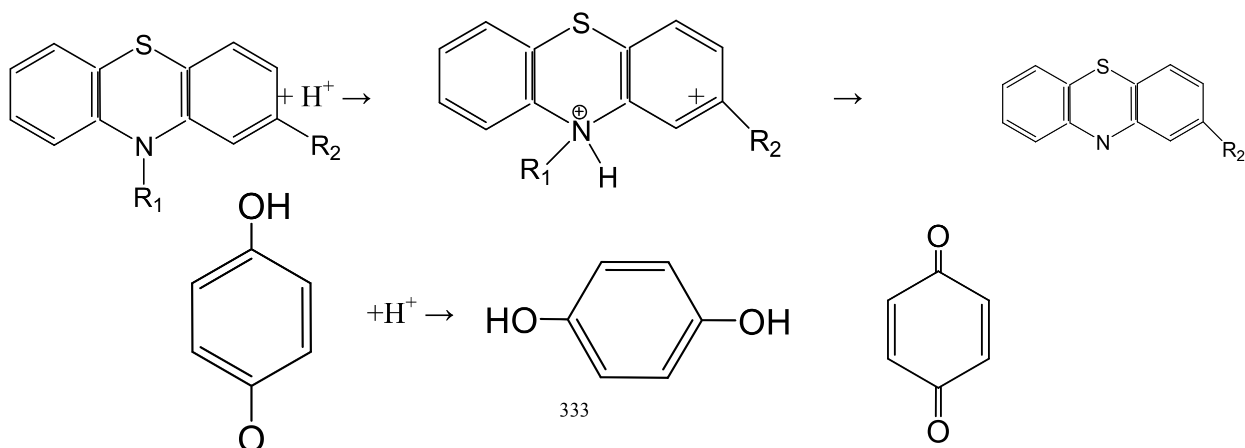
C. Dozare:

1. Metoda spectrofotometrică (tehnica Meunier):

Principiu:

Fenotiazinele, fiind puternic donori de electroni, reacționează cu acceptori de electroni – oxidanți anorganici şi organici – în mediu puternic acid (acizi: sulfuric, clorhidric,azotic). Colorațiile produse de oxalații anorganici puternici sunt nestabile, deoarece are loc o trecere de la o formă inițială de radicli la alți compuşi de oxidare, care diferă de radicalul cationic inițial prin proprietățile lor spectrofotometrice. De asemenea, acizii tari au ei înşişi capacitate oxidantă, putând induce reacții colorate şi cu alte medicamente (de exemplu, cu dibenzcicloheptadienele). Pentru a evita aceste inconveniente, sunt preferabili oxidanții organici, mai blânzi, ca chinhidrona (benzoparachinona) precum şi mediul de acid fosforic, cu un pK_a mai mic decât acizii uzuali.

Mecanismul reacției, propus de Meunier, este următorul: fenotiazina acceptând protonul de la acidu fosforic, trece într-un derivat cationic (1), cu azot cuaternar. Acesta cedează protonul chinhidronei sau benzoparachinonei, rezultând radicalul cationic (2), colorat, concomitent benzoparachinona se hidrogenează în două etape, ajungând în final la hidrochinonă:



Reactivi:
1. Reactiv benzoparachinonă-acid fosforic (v. identificare).
2. Soluția standard stoc: se aduc 0,1000g fenotiazină la 50 ml cu metanol. 1 ml = 2 mg.
3. Souție standard de lucru: se diluează soluția standard stoc în proporție de 1 : 100. 1 ml = 20 µg.

Modul de lucru:
Se reia cu metanol reziduul de la extragerea cu solvenți şi se aduce la 25 ml într-un balon cotat. Se iau 2,5 ml din această soluție şi se adaugă 0,2 ml reactiv benzoparachinonă-acid fosforic. Se citeşte extincția la spectrofotometru, la lungime de undă caracteristică fiecărei fenotiazinei (v. identificare).
Curba etalon se întocmeşte între 10 şi 50 µg/2,5 ml metanol (0,5-2,5 ml soluție standard de lucru, completat la 2,5 ml metanol.

Reactivi(ml)	Eprubeta					
	1	2	3	4	5	6(M)
Standard de lucru(1 ml=20µg)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	-
Conc.µg	10	20	30	40	50	-
Metanol	2.0	1.5	1.0	0.5	-	2.5
Reactiv Meunier	0.2ml-seagită					
Λ=carcateristică fiecărei fenotiazine						

Valoarea extincției pentru probă se raportează la curba de etalon, apoi se înmulțeşte cu 10- deoarece s-a lucrat cu 1/10 din probă- obținându-se concentrația C a fenotiazinei, în µg, în probă.

Caculul:
Rezultatele se exprimă în mg/100 ml sânge sau mg/1000 ml urină:

mg/100 ml sânge = C / A x 10
mg/1000 ml urină = C / A

în care:
C = concentrația fenotiazinei, în µg;
A = volumul de sânge (urină) luat în lucru, în ml.

Interpretarea rezultatelor:
1. În tratamente cu o doză unică, orală, de 25-150 mg clorpromazină, concentrațiile sanguine au fost de ordinul microgramelor/100 ml sânge; în tratamente prelungite cu doze zilnice de 600 mg/zi, de ordinul zecilor de micrograme/100 ml sânge, iar în tratamente psihiatrice cu doze de 1-2 g de 150-300 µg/100 ml şi chiar 1000µg/100 ml sânge.

2. În intoxicații cu 1,5-2 g clorpromazină, concentrațiile sanguine au fost de 0,5-1,5 mg/100ml sânge, iar în cazuri de deces, 1-44 mg/100ml sânge, de 54-2110 (în medie366) mg/kg ficat.

Bibliografie

Cotrău, M. *Toxicologie-principii generale*, Ed. Junimea, Iaşi, 1978.

Cotrău, M. *Toxicologia substanțelor organice*, Bucureşti, Ed. Ministerul Industriei Chimice, 1985.

Cotrău, M., Proca, M. Toxicologie analitică, Bucureşti, Ed. Medicală, 1988.

Cotrău, M., Popa, L., Stan, T., Preda, N. Toxicologie, Bucureşti, Ed. Didactică şi pedagogică, 1991.

Dănilă, G., Cotrău, M., Nechifor, M. Ghid de date toxicologice, Bucureşti, Ed. Medicală, 1984.

Drochioiu, G., Mangalagiu, I., Druță, I. Elemente de teorie şi practică toxicologică, Iaşi, Ed. Demiurg, 2001.

Drochioiu, G., Mangalagiu I., Druță I. Biochimie generală, Iaşi, Ed. Demiurg, 2002.

Gofiță, E., Ionică, F. Toxicologia medicamentului, Craiova, Ed. Medicală Universitară, 2007.

Ionescu, D., Drăgan, S., Dehelean, C. Elemente de toxicologie a medicamentului, Timişoara, Ed. Mirton, 2007.

Stroescu, V. Farmacologie, Bucureşti, Ed. Big All, 1999.

Voicu, V. Toxicologie clinic, Bucureşti, Ed. Albatros, 1997.

Cap. XIII Probleme speciale: otrăviri diverse

Sulfura de carbon, CS_2

Sulfura de carbon este o substanță volatilă (p.f. 46°C), incoloră, cu miros eterat Este inflamabilă, explozivă, insolubilă în apă, miscibilă în solvenți organici.

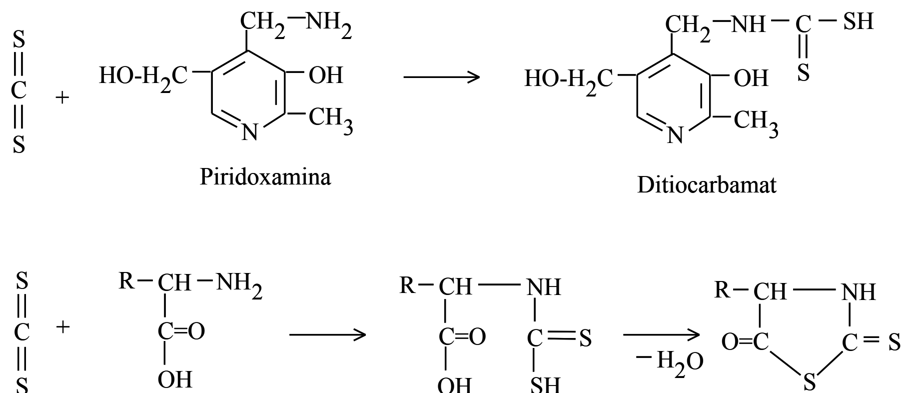
Toxicocinetică. Sulfura de carbon pătrunde în corp pe cale respiratorie şi, uneori, transcutanat şi digestiv. Din cantitatea inhalată, marea majoritate se elimină respirator, restul este vehiculat de hematii şi distribuit în țesuturile grase. Majoritatea sulfurii de carbon absorbite este metabolizată la compuşi organici şi anorganici cu sulf.

Toxicodinamie. Această substanță acționează asupra sistemului nervos şi a metabolismului. Sulfura de carbon acționează ca antimetabolit al piridoxaminei, cu formare de compuşi ditiocarbamici, ceea ce explică deficiența în vitamina B_6 în intoxicațiile cu această substanță (fig. 15). Carența în vitamina B_6 determină scăderea formării acidului nicotinic din triptofan, sinteza fiind deviată spre derivați xanturenici. Acidul nicotinic este un component al coenzimelor NAD şi NADP, astfel încât sunt perturbate respirația celulară, glicoliza, sinteza acizilor graşi, dependente de aceste coenzime. Sulfura de carbon reacționează cu grupările NH_2 proteice, rezultând derivați ditiocarbamici şi tiazolidone, chelatează Zn, Mn, Cu, Mg, Co, inhibând enzimele cărora aceste metale le servesc drept cofacturi, cu dereglarea consecutivă a unor metabolisme. Doza letala este de 10 ml, iar doza toxică prin inhalare 2-3 mg/l.

Simptomatologie. În *intoxicația acută* se produce "beția sulfocarbonică" şi apar manifestări neuropsihice (agitație, halucinații, delir), apoi stupoare, comă şi moarte. *Intoxicația subacută* prezintă cefalee, oboseală, urmate de psihoză maniaco-depresivă (impulsivitate, accese de furie, insomnie, halucinații, depresiune). *Intoxicația cronică* se manifestă prinsindrom astenovegetativ urmat de lezarea organică a SNC cu manifestări de tip encefalopatie toxică şi/sau polinevrită senzitivo-motorie; uneori este afectat nervul optic. Mai apar simptome digestive, endocrine (suprarenale, gonade), vasculare (ateroscleroză cerebrală şi renală).

Contactul pielii cu sulfura de carbon poate provoca iritații şi uneori chiar forme de leziuni eczematoase.

Primul ajutor constă în spălatură gastrică cu suspensie de cărbune şi purgativ salin, iar la inhalare şi contact, decontaminare prin spălare cu apă şi oxigenoterapie şi/sau respirație artificială.



Efecte toxice ale sulfurii de carbon (inhibarea piridoxaminei si reactia cu grupele NH_2 proteice)

Toxicologie analitică. Sulfura de carbon se recoltează din aer în soluții alcoolice de amine secundare. Din medii biologice, se antrenează cu vapori de apă sau cu un curent de aer şi fixare în soluție alcoolică de amine secundare. Identificarea se realizează prin formarea xantogenatului cupros galben, sau prin reacția cu amine secundare (formare de ditiocarbamat cupric galben), care se pretează şi la dozare. La persoanele expuse, se cercetează dietilditiocarbamații, metaboliți ai CS_2 prin testul iodazidei (acest compus catalizează reacția de reducere a iodului de către azida de sodiu).

Se mai pot utiliza tuburi Dräger special calibrate pentru CS_2.

Detergenții

Detergenții sunt substanțe tensioactive ce conțin în moleculă un fragment hidrofil şi unul hidrofob. Interes toxicologic major prezintă detergenții cationici (DL_{50} = 0,05 ─ 0,50 g/kg), urmați de detergenții anionici (DL_{50} = 2 ─ 7 g/kg), în timp ce detergenții neionici sunt practic netoxici (DL_{50} = 50 g/kg).

Detergenții cationici pot determina colaps (acțiune ganglioplegică) şi paralizie respiratorie (acțiune curarizantă). Fiind substanțe tensioactive, detergenții facilitează absorbția digestivă sau cutanată a substanțelor insolubile, favorizând producerea efectelor toxice (cancerigene) ale acestora. Primul ajutor constă în spălătură gastrică şi purgativ salin. Antidotul pentru detergenții cationici constă într-o soluție de săpun, 5 g în 20 ml apă, apoi provocare de vărsături.

Anilina, $C_6H_5NH_2$

Anilina este un lichid incolor, uleios, care devine galben până la brun la aer şi la lumină. Are un miros puternic, caracteristic. Este puțin solubilă în apă, dar solubilă în solvenți organici. Concentrația maxima admisibilă este de 5 mg/m^3 aer.

Toxicocinetică. Anilina pătrunde în organism respirator, transcutanat şi digestiv. După absorbție, se distribuie în țesuturile lipoide. Se metabolizează prin oxidare la fenilhidroxilamină, care se izomerizează parțial la p-aminofenol, excretat urinar ca sulfo- şi glucuronoconjugat. Faptul că biotransformarea anilinei conduce la metaboliți comuni cu ai nitrobenzenului explică efectele toxice asemănătoare ale celor două substanțe. O fracțiune din anilină se N-acetilează.

Toxicodinamie. Anilina se caracterizează prin acțiune methemoglobinizantă, hemolitică şi neurotoxică. Se admite şi o acțiune cancerigenă la nivelul vezicii urinare, care însă s-ar datora în special impurităților (benzidina şi β-naftilamina). Local, anilina este iritantă şi necrozantă: doza letală este de 1-2 g.

Simptomatologie. În *intoxicația acută* se observă aceleaşi manifestări ca la nitrobenzen: cianoză şi consecințele hipoxiei (cefalee, grețuri, vărsături, confuzie, vertije, dezorientare, somnolență, stupoare, comă). În plus apare iritația căilor urinare şi a vezicii. În cazurile grave intervin tulburări cardiovasculare, insuficiență renală acută şi moarte prin stare de şoc. *Intoxicația cronică* se exprimă prin tulburări neurovegetative şi afectare hepato-renală.

Primul ajutor. La ingerare se aplică spălătură gastrică cu soluție de $KMnO_4$ 1/10000, apoi purgativ salin; în rest, măsurile indicate la nitrobenzen. Profilaxia presupune măsurile generale de protecție.

Toxicologie analitică. Anilina se determină din aer (recoltare în HCl diluat sau H_2SO_4 0,01 N) şi medii biologice
(distilare sau antrenare cu vapori de apă în mediu alcalin şi extragere cu solvenți organici). Identificarea se face prin reacția Hoffmann (ca izonitril), reacția moveinei (cu hipoclorit), reacția Jacquemin (cu fenol şi hipoclorit) sau prin reacția de diazotare şi cuplare. Se dozează prin reacția Jacquemin. De asemenea, se poate folosi metoda spectrofotometrică cu cloramină T şi fenol când se obține o colorație albastră a cărei intensitate este proporțională cu cantitatea de anilină din probă. Pentru dozare, se mai face apel la metoda titrimetrică cu soluție bromat-bromură.

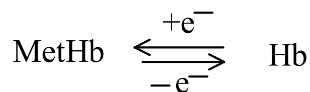
Nitrobenzenul, $C_6H_5NO_2$
Nitrobenzenul este un lichid uleios, d = 1,2, gălbui, cu miros de migdale amare, volatil (p.f. 211^oC), puțin solubil în apă, solubil în solvenți organici. Concentrația maximă admisibilă este de 5 mg/m^3 aer.

Toxicocinetică. Nitrobenzenul pătrunde în organism respirator, transcutanat şi, rareori, digestiv. Este metabolizat la nitrozobenzen, fenilhidroxilamină şi anilină sub acțiunea reductazelor NADH- şi NADPH-dependente microzomiale, hidroxilare la nucleu conducând la compuşi fenolici in echilibru cu p-chinonmonooxima şi p-chinonimina.

Din cantitatea absorbuită, 50% se elimină pulmonar nemodificat, 25% urinar ca p-aminofenol şi p-nitrofenol, ambii sulfo-şi glucuronoconjugați.

Toxicodinamie. Principalele acțiuni toxice ale nitrobenzenului şi metaboliților săi sunt:

– Acțiunea methemoglobinizantă (methemoglobina se obține prin oxidarea Fe^{2+} din hemoglobină la Fe^{3+}). În mod normal, în organism există un echilibru între MetHb existentă


$$MetHb \underset{-e^-}{\overset{+e^-}{\rightleftarrows}} Hb$$

în concentrație de 2 % raportat la Hb totală) şi Hb. Reconversia MetHb la Hb necesită donori de electroni, prin care Fe^{3+} trece în Fe^{2+}:

Aceşti donori sunt :

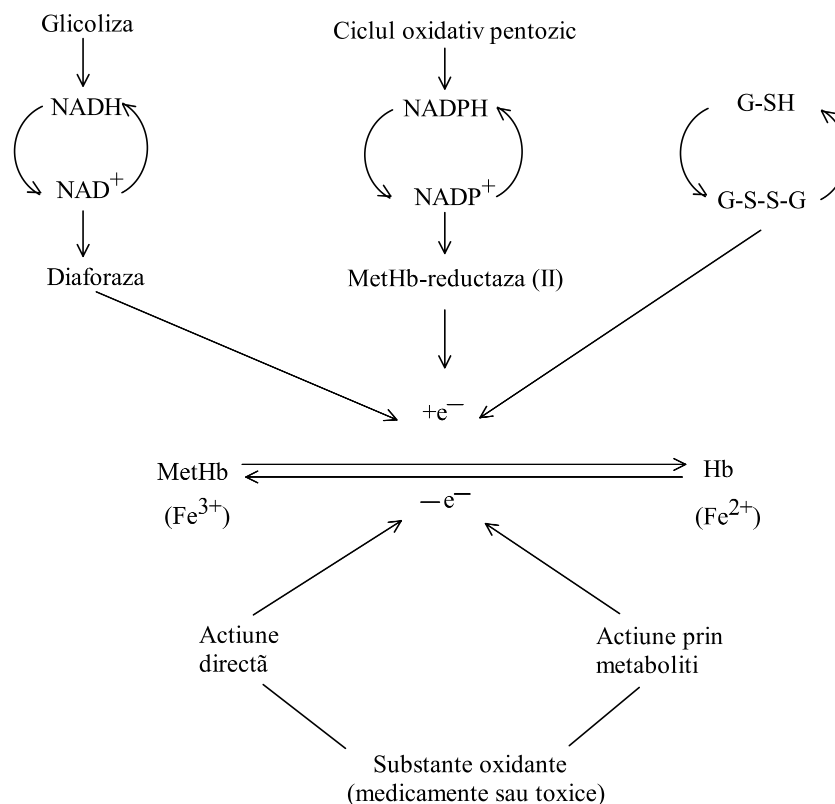
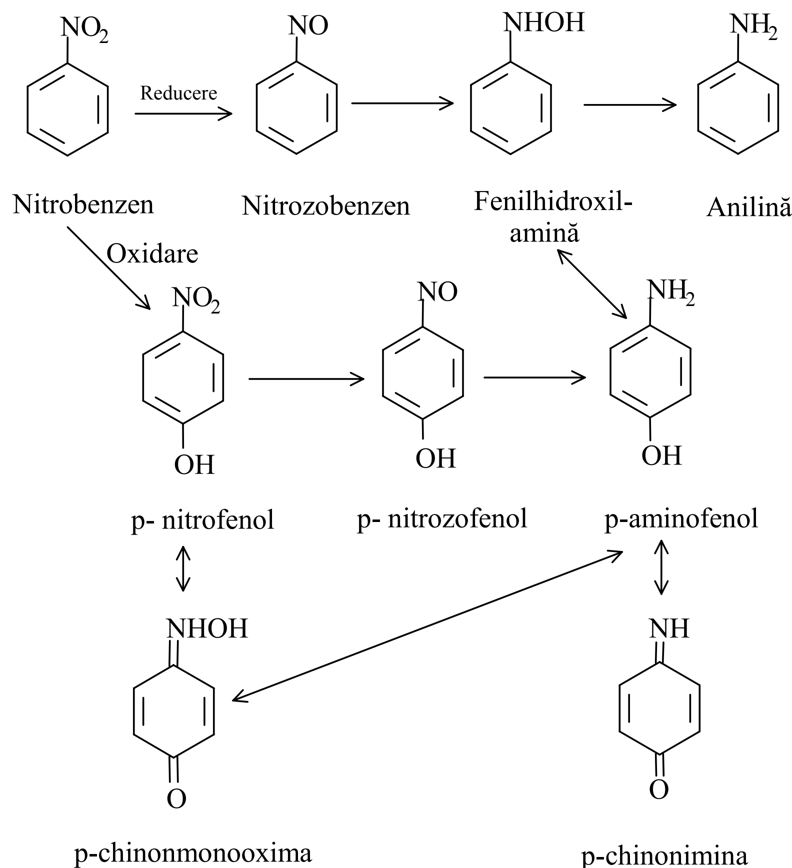


Fig. 14. Echilibrul methemoglobinã-hemoglobinã

— NADP (format în cursul glicolizei) trece un e^- pe MetHb prin intermediul acceptorului diaforaza;

— NADPH (format în cursul oxidării glucozei pe calea şuntului pentozic) trece un e^- pe MetHb prin intermediul acceptorului MetHb-reductaza;

— Glutationul redus (G-SH) transformă H_2O_2 (prezentă în mici cantități în hematii) în H_2O; altfel, H_2O_2 în exces ar oxida Hb la MetHb.



Biotransformarea nitrobenzenului (dupã Bedeleanu si Kory)

În prezența oxidanților, acestea desprind un e¯ şi trec Fe^{2+} în Fe^{3+} cu o viteză care depăşeşte capacitatea de reducere a donorilor de electroni; ca urmare, apare methemoglobinemia. Hb este transportor de oxigen, deoarece formează cu acesta $HbFe^{2+}O_2$ (oxiferohemoglobină). Dimpotrivă, MetHb nu este transportor de oxigen, deoarece formează $HbFe^{3+}OH$ (hidroxiferihemoglobina) unde a treia valență a fierului este blocată cu gruparea – OH şi, în consecință, apar hipoxemie şi hipoxie.

─ Acțiunea hemolitică: la methemoglobinemie masivă se produce liza hematiilor, cu eliberarea Hb în stroma globulară şi trecerea ei în plasmă. Hb plasmatică nu transportă oxigenul şi este nefrotoxică (precipită în tubiirenali). Datorită afinității pentru proteine, fenilhidroxilamina (şi, posibil, şi alți intermediari din biotransformarea nitrobenzenului) degradează ireversibil Hb prin desprinderea hemului, denaturarea globinei (prin reacție cu grupările SH şi S-S) şi încorporează un atom de sulf în ciclurile pirolice ale hemului; apar sulfhemoglobina şi verdoglobina.

─ Acțiunea neurotoxică (deprimarea SNC) se datoreştenitrobenzenului (liposolubil) şi anoxiei determinate de methemoglobinemie.

─ Acțiunea cardiotoxică se manifestă asupra fibrei miocardice şi a sistemului de conducere şi se explică prin afinitatea fenilhidroxilaminei pentru proteinele tisulare, ca şi prin anoxie.

─ Acțiunea hepatotoxică se explică prin afinitatea metaboliților nitrobenzenului pentru proteinele tisulare.

— Acțiunea iritantă şi sensibilizantă prin delipidare, rezultând dermatoze şi acțiune indirectă alergică (prin metaboliții cu afinitate pentru proteine) asupra tegumentelor şi mucoaselor respiratorii, determinând reacții alergice cutanate şi respiratorii. Doza letală la ingerare este de 1-2 g.

Simptomatologie. *Intoxicația acută* se exprimă clinic prin cianoză datorită methemoglobinemiei. Dacă MetHb depăşeşte 15%, se remarcă cianoza extremităților. La 15-40% MetHb intervine anoxia (cefalee, amețeli, dispnee). Peste 40% MetHb apar anxietate, astenie, grețuri, tahicardie, tulburări audio-vizuale şi de echilibru. Peste 75% MetHb se instalează depresiunea centrală, cu deces practic inevitabil. Tardiv, dacă victima supraviețuieşte, se manifestă consecințele hemolizei (nefropatie tubulo-renală, icter hemolitic, anemie hemolitică). La ingerare apar şi tulburări digestive. Contactul cutanat derternimă dermatoze. *Intoxicația cronică* se manifestă prin tegumente palide, sindrom astenovegetativ, tulburări digestive, afectare hepatorenală.

Primul ajutor constă în spălătură gastrică cu suspensie de cărbune, urmată de purgativ salin. La inhalare, se face apel la spălare abundentă cu apă şi oxigenoterapie. Se administrează albastru de metilen.

Toxicologie analitică. Nitrobenzenul se cercetează din aer sau medii biologice (antrenare cu vapori de apă în mediu de acid tartric şi extragere cu eter, apoi reducere cu Zn şi HCl la anilină, eliberarea anilinei-bază prin alcalinizarea mediului şi identificarea/dozarea acesteia.

Nitrobenzenul se mai poate determina polarografic şi spectrofotometric, prin reacția de formare a unui azoderivat de culoare portocalie, folosind ca reactiv de cuplare N-(1-naftiletilendiamina)-hidroclorică..

Din urină, se extrage metabolitul conjugat cu eter, după hidroliză.

Methemoglobina se determină prin dozarea ei pe baza absorbției caracteristice la 630 nm, apoi se transformă MetHb în cianmethemoglobină (CNMetHb) şi se măsoară absorbția acesteia de asemenea la 630 nm. În paralel se dozează Hb totală prin tratare cu fericianură şi apoi transformare în CNMetHb.

Cap. XIV. Toxicologul ca martor expert

Toxicologul criminalist este adesea chemat să depună mărturie în instanță cu privire la constatările sale analitice şi la interpretarea lor. Deşi puțini toxicologi au o diplomă medicală, aceştia stabiliesc frecvent în instanță efectele drogurilor sau a otrăvurilor asupra organismului uman. Când este întrebat cu privire la constatările sale analitice, toxicologul trebuie să arate în primul rând că el a păstrat toate probele analizate. Acesta trebuie să declare în scris că toate probele au fost recoltate de la victima la care se face referire în proces şi că probele au fost stocate înainte, în timpul şi după analiză într-un mod care a împiedicat persoane neautorizate să le manipuleze fraudulos.

Toxicologul trebuie să fie bine familiarizat cu principiile, procedurile şi limitele testelor pe care le realizează. Interpretarea lui trebuie să reflecte cunoaşterea literaturii de specialitate, precum şi propria sa experiență cu cazuri similare. Deşi poate că nu este de acord cu alți experți în domeniu, toate concluziile sale trebuie să se bazeze pe cunoştințe ştiințifice sau medicale solide. Ca şi în cazul tuturor martorilor experți, toxicologul criminalist trebuie să prezinte toate dovezile cu onestitate şi integritate. Dacă el nu cunoaşte răspunsul corect la o întrebare, acesta trebuie să răspundă că nu ştie.

Prezentarea de dovezi fizice în instanță de către un expert este testul final de valabilitate a probelor. Concluziile trase de expert trebuie să îndeplinească standardele riguroase ale dovezilor ştiințifice şi să reziste la o examinare încrucişată a avocatului la proces. Dovezile fizice şi concluziile ştiințifice trebuie explicate juriului într-un mod uşor de înțeles pentru a se putea ajunge la un verdict într-un caz anume. De aceea, expertul criminalist trebuie să cântărească imparțial toate datele acumulate şi, dacă este convins sau nu de vinovăția inculpatului, să prezinte doar fapte şi concluzii valide în instanță. Altfel, probele sale pot fi puse la îndoială, iar valoarea sa ca expert va scade.

Inducerea mărturiei la un suspect

În multe cazuri, prezintarea de informații faptice bazate pe probe fizice unui individ bănuit de crimă, cum ar fi sângele victimei identificat pe hainele sale sau amprente găsite pe o armă, îl va determina să recunoască implicarea într-o crimă. Acelaşi lucru se poate întâmpla dacă asupra sa au fost găsite droguri sau substanțe toxice interzise. In principiu, foarte mulți infractori regretă faptele, doresc să se despovăreze de zbuciumul sufletesc, mai ales dacă sunt la prima abatere. Teama de pedeapsă sau de necunoscut îi poate determina să-şi amâne măturia. De aceea, dovedirea acestora este foarte importantă şi pentru simplificarea procesului de justiție. Pe de altă parte, unele persoane care nu au comis fapte penale recunosc vinovății închipuite pentru a scăpa de teama unei pedepse mai mari. In acest caz este meritul criminaliştilor de a-i exonera de vină aducând dovezi clare ale nevinovăției acestor persoane şi îndreptând ancheta către adevărații făptaşi.

Pot fi găsite dovezile fizice că o persoană nu a comis o crimă. Un exemplu de acest tip de dovezi ar fi prezența ADN-ului in lichidul seminal din probe vaginale la o victimă a unui violul, care nu se potriveşte suspect.

Documentare şi valorificarea datelor

Calitatea dovezilor fizice aduse în instanța de judecată depinde de buna observare, documentare, de colectare, conservarea, ambalarea şi de prelevarea probelor la locul crimei, precum şi de la victimă şi suspect. Acest lucru edepinde de calificarea şi meticulozitatea de anchetatorilor locul crimei, a detectivilor şi patologilor implicați în caz, precum şi de calitatea metodelor ştiinţifice utilizate de către toxicologii medico-legali. Acest lucru este realizat prin instruirea corespunzătoare şi experiența anchetatorilor şi examinarea ştiințifică a probelor fizice în laborator. Păstrarea dovezilor fizice trebuie să se mențină pe parcursul întregului proces, inclusiv analiza şi stocarea ulterioară. Acest lucru este necesar pentru a asigura admisibilitatea probelor fizice în cadrul procedurilor judiciare şi la procesul de acuzat. Mai mult, probele fizice pot fi solicitate pentru contraexpertiză şi, dacă nu sunt corect conservate, etichetate, ambalate, pot conduce la alte concluzii.

Este necesar să se mențină relația dintre dovezile fizice înainte de colectare şi de ambalare de la locul crimei. Astfel, se realizează fotografii, note scrise, şi diagrame care arată unde erau obiectele incriminate. Suspectul consumator de droguri poate prezenta urme de injecții, poate avea contuzii etc. Ambalajele trebuie să fie corespunzătoare şi etichetate, iar toxicologul să nu introducă accidental alte elemente la locul faptei. Trebuie luate măsuri pentru a nu modifica, denatura sau contamina dovezile înainte de analiză. Elementele colectate ar trebui marcate cu un număr secvențial, raportat la locul specifice în care a fost descoperit notând ora şi data şi parafat de către persoana colectarea probelor. Materiale cu risc biologic, cum ar fi sângele şi fluidele corpului, ar trebui plasate în containere marcate în mod clar. Protocoalele de colectare a probelor şi de ambalare ar trebui respectate cu strictețe. De exemplu, materialele pătate de sânge ar trebui uscate bine la aer, înainte de ambalare. Aceasta evită activitate bacteriană care ar putea împiedica analize ulterioare. Containere speciale sunt necesare pentru colectarea de urmelor de probă pentru a evita pierderea şi contaminarea. O bună comunicare între laborator şi tehnicienii de la scena crimei este esențial pentru a se asigura că procedurile standard sunt respectate.

Probleme teoretice speciale în toxicologia judiciară

În mod normal, în cadrul biologiei moleculare actuale, se studiază numai acțiunea toxicilor la nivel molecular, la fel cum se studiază substanțele chimice din natură fără a le raporta la legăturile acestora cu mediul înconjurător. Toxicii prezintă însă efecte şi asupra structurilor supramoleculare şi a nivelurilor superioare celui molecular. Structura energetică a corpului viu poate fi afectată prin simpla prezență a unei substanțe, aşa cum, de pildă, este afectat un aparat electronic atunci când introducem obiecte metalice în acesta; nu contează compoziția şi reacția chimică a componentelor sale cu circuitele electrice, ci doar modificarea configurației circuitelor.

Substanțele străine corpului prezintă structuri şi proprietăți diferite şi sunt transformate în corp în substanțe proprii acestuia, prin efortul organismului. Pentru a le degrada şi transforma în substanțe proprii au loc reacții care restabilesc armonia dintre elementele constitutive ale corpului. Dacă se realizează acest lucru, are loc vindecarea. Dar, pentru a le degrada, organismul trebuie să le cunoască. În general, toate substanțele, chiar şi cele

alimentare obişnuite, luate în cantitate prea mare devin toxice, deoarece organismul nu este capabil sa le digere, să le transforme.

Pentru degradarea şi asimilarea produşilor rezultaţi, corpul face un efort care-l fortifică aşa cum se întăresc muşchii ca urmare al unui efort gradat continuu. Dacă solicitările depăşesc posibilităţile organismului, acesta, dimpotrivă, slăbeşte. Aceste substanţe se comportă atunci ca toxici.

Dacă substanţele chimice utilizate curent ajung în corp, acestea pot fi mai uşor sau mai greu de degradat, în funcţie de asemănarea lor cu substanţele naturale cunoscute. De anumite substanţe organice, corpul nu se poate debarasa şi acestea se depozitează, precum DDT în grăsimi, afectându-le funcţiile lor specifice. In corp, apar astfel structuri străine care perturbă structural organismul (Bott, 1976).

După o concepţie cibernetică, toate organismele vii se află în echilibru nestabil cu mediul înconjurător. Organismul viu reprezintă o entitate de sine stătătoare, relativ independentă faţă de mediul extern care prezintă procese coordonate pentru a-şi conserva identitatea, structura proprie şi funcţiile specifice. De aceea, o substanţă străină corpului intervine în echilibrul organismului în mod pasiv, provocând reacţia acestuia, sau activ prin reacţia sa cu componentele moleculare ale acestuia.

Distingem astfel: a) substanţe benefice echilibrului organismului, cum ar fi apa pură, aminoacizii esenţiali, unele vitamine, etc.; b) substanţe şi produse utilizate ca alimente şi care au un caracter relativ nociv numai în cantitate mare; c) medicamente, care, în doze ponderale, readuc la normal echilibrul perturbat. Între acestea se află şi remediile homeopatice care reprezintă soluţii cu concentraţii infinitezimale, unele chiar dincolo de limitele numărului lui Avogadro, capabile să ofere corpului bolnav informaţia de care are nevoie pentru autoechilibrare; d) substanţe toxice, factori care au tendinţa de a rupe echilibrul dintre individ (sau descendenţa sa) şi mediul înconjurător aceştia putând avea o natură fizică, chimică sau chiar psihică.

Toxicul îşi poate manifesta acţiunea în mod direct prin reacţia sa cu unele componente ale corpului (cianurile reacţionează cu ionii Fe^{3+} din citocromoxidaza pe care o inactivează) sau indirect, prin produşii săi de degradare (formaldehida şi acidul formic proveniţi din metanol sunt, la rândul lor, toxici).

De asemenea, unii toxici cu acţiune lentă, cum ar fi substanţele cancerigene, *suprasolicită* organismul, până la epuizare energetică într-un proces de îndepărtare al acestora sau a produselor lor de degradare. În acest caz, toxicii se manifestă pasiv, iar organismul uman sau animal acţionează nespecific asupra lor, în timp ce aceştia perturbă funcţiile organelor şi ţesuturilor prin prezenţa lor sau prin produsele lor de degradare şi compuşii lor cu moleculele existente în organism.

Otrăvirea reprezintă ansamblul de semne şi simptome – constituind o stare patologică – care se instalează după pătrunderea unei otrăvi în organism. Ca urmare se produce dereglarea, alterarea sau chiar abolirea unor funcţii vitale, uneori cu sfârşit letal. Hans Selye (1984) constată în cazul *tuturor agresiunilor*, inclusiv a intoxicaţiilor, o reacţie stereotipă din partea organismului afectat. A numit-o *sindrom general de adaptare*, deoarece aceasta permite corpului să răspundă activ factorilor din mediul extern. Sindromul general de adaptare cuprinde mai multe faze, şi anume: o fază de alarmă, o fază de adaptare şi, în fine, una de epuizare, în care caz sistemele de protecţie ale corpului sunt depăşite. În oricare din aceste etape de răspuns la agresiunea toxicului, în funcţie de intensitatea acestuia, animalul sau omul pot muri. Toxicii cu acţiune moderată, dar de lungă durată determină o a patra fază a sindromului general de adaptare: faza canceroasă.

Bibliografie generală

Bogusz, M. J. (2008) Opioids: methods of forensic analysis. In *Forensic Science,* Vol. 6: *Handbook of analytical separation,* M. J. Bogusz Edit.. 2nd Ed., Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, pp.3-117.

Crouch, D.J., Hersch, R.K., Cook, R.F., Frank, J.F., Walsh, J.M. (2002) *J. Anal. Toxicol*., 26, 493.

Dhawan, B. N., Cesselin, F., Raghubir, R., Reisine, T., Bradley, P. B., Porthogese, P. S., Hamon, M. (1996) Classification of opioid receptors. *Pharmacol. Rev*., 48, 567-592.

Jenkins, A. J., Goldberger, B. A. (2002) On-site drug testing. Humana Press, Totowa, New Jersey.

Kilpatrick, G. J., Smith, T. W. (2005) Morphine-6-glucuronide: actions and mechanisms. *Med. Res. Reviews*, 25, 521-544.

Sporer, K. A. (2003) Strategies for preventing heroin overdose. *Brit. Med. J.*, 326, 442-444.

Proca, M., E. Butnaru, L. Agoroaei – Lucrări practice de toxicologie. Universitatea de medicină şi farmacie "Gr. T. Popa" Iaşi, Centrul de multiplicare UMF, Iaşi, 1996.

T. J. Haley, W. O. Berndt, Handbook of toxicology, Harpen and Row, Cambridge, New York, Philadelphia, 1987.

Kimmel, C. A., Buelke-Sam, J. Developmental toxicology, Raven Press, 1981.

Cotrău, M. Implicații ale consumului de etanol în industria chimică. M.I.Ch., Iaşi, 1983.

Cotrău, M. Toxicologia substanțelor organice. Edit. M.I.Ch., Iaşi, 1985.

Cotrău, M. Toxicologie, Edit. did şi ped., Bucureşti, 1993.

Drochioiu, G., Mangalagiu, I., Druță, I. Toxicologie, Edit. Tao, Suceava, 1999.

Castiglioni, S., Zuccato, E., Fanelli, R. (eds.) Mass spectrometric analysis of illicit drugs in the environment. Wiley-Interscience Series on Mass Spectrometry, 2011, Ed., ISBN 978-0-470-52954-6

A.J. Jenkins and B.A. Goldberger (Eds.), On-site drug testing. Humana Press, Totowa, New Jersey, 2002.

M. Gronholm and P. Lillsunde, Forensic Sci. Int., 121 (2001) 37.

R. Wennig, M. Moeller, J.M. Haguenoer, A. Marocchi, F. Zoppi, B.L. Smith, R. de la Torre, C.A. Carstensen, A. Goerlach-Graw, J. Schaeffler and R. Leibberger, J. Anal. Toxicol., 22 (1998) 148.

B. Buchan, J.M. Walsh and P.E. Leaverton, J. Forensic Sci., 43 (1998) 395.

C. Barrett, C. Good and C. Moore, Forensic Sci. Int., 122 (2001) 163.

S. George and S. Parmar, J. Anal. Toxicol., 26 (2002) 233.

J.M. Holler, T.Z. Bosy, K.L. Klette, R. Wiegand, J. Jemionek and A. Jacobs, J. Anal.

Toxicol., 28 (2004) 489.
E.J. Cone, S. Dickerson, B.D. Paul and J.M. Mitchell, J. Anal. Toxicol., 16 (1992) 72.
D.A. Armbruster, R.H. Scharzhoff, E.C. Hubster and M.K. Liserio, Clin. Chem., 39 (1993) 2137.
M.L. Smith, E.T. Shimomura, J. Summers, B.D. Paul, D. Nichols, R. Shippee, A.J. Jenkins, W.D. Darwin and E.J. Cone, J. Anal. Toxicol., 24 (2000) 522.
E.J. Cone, L. Presley, M. Lehrer, W. Seiter, M. Smith, K.W. Kardos, D. Fritch, S. Salamone and
R.S. Niedbala, J. Anal. Toxicol., 26 (2002) 541.
M.L. Cheever, G.A. Armendariz and D.E. Moody, J. Anal. Toxicol., 23 (1999) 500.
K. Moore, C. Werner, R.M. Zannelli, B. Levine and M.L. Smith, Forensic Sci. Int., 106 (1999) 93.
P. Kemp, G. Sneed, T. Kupiec and V. Spiehler, J. Anal. Toxicol., 26 (2002) 504.
S. Kerrigan and W.H. Phillips, Clin. Chem., 47 (2001) 540.
H. Schu¨ tz, F. Erdmann, M. Risse and G. Weiler, Arzneimittelforschung, 52 (2002) 716.
J.T. Cody and S. Valtier, J. Anal. Toxicol., 25 (2001) 466.
J.T. Cody, S. Valtier and J. Kuhlman, J. Anal. Toxicol., 25 (2001) 572.
K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, M. Krogh, H.G. Ugl and T. Grønhaug, J. Chromatogr.
A, 873 (2000) 3.
H.G. Ugland, M. Krogh and K.E. Rasmussen, J. Chromatogr. A, 749 (2000) 85.
T.S. Ho, S. Pedersen-Bjergaard and K.E. Rasmussen, J. Chromatogr. A, 963 (2002) 3.
T.S. Ho, S. Pedersen-Bjergaard and K.E Rasmussen, Analyst, 127 (2002) 608.
V. Marko, L. Soltes and K. Radova, J. Chromatogr. Sci., 28 (1990) 403.
L. Soltes, Biomed. Chromatogr., 6 (1992) 43.
A. Gelencser, G. Kiss, Z. Krivacsy, Z. Varga-Puchony and J. Hlavay, J. Chromatogr. A, 693 (1995) 217.
J. Scheurer and C.M. Moore, J. Anal. Toxicol., 16 (1992) 264.
E.M. Thurman; M.S. Mills, Solid phase extraction: principles and practice, John Wiley & Sons, New York, 1998.
D.L. King, M.J. Gabor, P.A. Martel and C.M. O'Donnell, Clin. Chem., 35 (1989) 163.
D.D. Blevins and D.O. Hall, LC-GC Int. (1998), Suppl., September 17, pp. 16–21.
F. Degel, Clin. Biochem., 29 (1996) 529.
R.A. De Zeeuw, J. Wijsbeek and J.P. Franke, J. Anal. Toxicol., 24 (2000) 97.
J.O. Svensson, A. Rane, J. Sa¨ we and F. Sjo¨ qvist, J. Chromatogr., 230 (1982) 427.
A.I. Bouquillon, D. Freeman and D.E. Moulin, J. Chromatogr., 577 (1992) 354.
I. Papadoyannis, A. Zotou, V. Samanidou, G. Theodoridis and F. Zougrou, J. Liq. Chromatogr., 16 (1993) 3017.
G. Theodoridis, I. Papadoyannis, H. Tsoukali-Papadopoulou and G. Vasilikiotis, J. Liq. Chromatogr., 18 (1995) 1973.
A. Geier, D. Bergemann and L. von Meyer, Int. J. Legal Med., 109 (1996) 80.
W. Huang, W. Andollo and W.L. Hearn, J. Anal. Toxicol., 16 (1992) 307.

X.H. Chen, A.L.C. Hommerson, P.G.M. Zweipfenning, J.P. Franke, C.W. Harmen-Boverhof, K. Ensing and R.A. de Zeeuw, J. Forensic Sci., 38 (1993) 668.
H. Lord and J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A, 885 (2000) 153.
F. Sporkert and F. Pragst, J. Chromatogr. B, 746 (2000) 255.
A.M. Bermejo, R. Seara, A.C. Dos Santos Lucas, M.J. Tabernero, P. Fernandez and R. Marsili, J. Anal. Toxicol., 24 (2000) 66.
A.C. Dos Santos Lucas, A. Bermejo, P. Fernandez and M.J. Tabernero, J. Anal. Toxicol., 24 (2000) 93.
S.W. Myung, S. Kim, J.H. Park, M. Kim, J.C. Lee and T.J. Kim, Analyst, 124 (1999) 1283.
U. Staerk and W.R. Kulpmann, J. Chromatogr. B, 745 (2000) 399.
N. Fucci, N. De Giovanni and M. Chiarotti, Forensic Sci. Int., 134 (2003) 40.
G. Guiochon, Int. Lab., 29 (1999) 13C.
V. Cirimele, P. Kintz, R. Majdalani and P. Mangin, J. Chromatogr. B, 673 (1995) 173.
W.E. Brewer, R.C. Galipo, K.W. Sellers and S.L. Morgan, Anal. Chem., 73 (2001) 2371
D.L. Allen, K.S. Scott and J.S. Oliver, J. Anal. Toxicol., 23 (1999) 16.
K.S. Scott and J.S. Oliver, Med. Sci. Law., 39 (1999) 77.
C. Staub, Forensic Sci. Int., 84 (1997) 295.
C. Radcliffe, K. Maguire and B. Lockwood, J. Biochem. Biophys. Methods, 43 (2000) 261.
Z. Fater, Z. Samu, M. Szatmary and S. Nyiredy, Acta Pharm. Hung., 67 (1997) 211.
A.M. Al-Amri, R.M. Smith, B.M. El-Haj and M.H. Juma'a, Forensic Sci. Int., 140 (2004) 175.
A.M. Al-Amri, R.M. Smith and B.M. El-Haj, Anal. Bioanal. Chem, 382 (2005) 830.
J.L. Janicot, M. Caude and R. Rosset, J. Chromatogr., 437 (1988) 351.
L. Krenn, S. Glantschnig and U. Sorgner, Chromatographia, 47 (1998) 21.
V.C. Trenerry, R.J. Wells and J. Robertson, J. Chromatogr. A, 718 (1995) 217.
I.S. Lurie, S. Panicker, P.A. Hays, A.D. Garcia and B.L. Geer, J. Chromatogr. A, 984 (2003) 109.
M.J. Bogusz, Opioid agonists, in: M.J. Bogusz (Ed.) R.M. Smith (Series Ed.), Forensic Science, Handbook of Analytical Separations, Vol. 2. Elsevier Sciences, Amsterdam, 2000, pp. 3–65.
K. Bjerver, J. Johnsson and J. Schuberth, J. Pharm. Pharmacol., 34 (1982) 798.
G. Fritschi and W.R. Prescott Jr, Forensic Sci. Int., 27 (1985) 111.
R.E. Struempler, J. Anal. Toxicol., 11 (1987) 97.
A.B. Zebelman, B.L. Troyer, G.L. Randall and J.D. Batjer, J. Anal. Toxicol., 11 (1987) 131.
H.N. ElSohly, M.A. ElSohly and D.F. Stanford, J. Anal. Toxicol, 14 (1990) 308.
C.M. Selavka, J. Forensic Sci., 36 (1991) 685.
K.D. Meneely, J. Forensic Sci., 37 (1992) 1158.
M.G. Pelders and J.J.W. Ros, J. Forensic Sci., 41 (1996) 209.
G. Casella, A.H.B. Wu, B.R. Shaw and D.W. Hill, J. Anal. Toxicol., 21 (1997) 376.
C. Meadway, S. George and R. Braithwaite, Forensic Sci. Int., 96 (1998) 29.
M.R. Moeller, K. Hammer and O. Engel, Forensic Sci. Int., 143 (2004) 183.
R.J. Lewis, R.D. Johnson and R.A. Hattrup, J. Chromatogr. B, 822 (2005) 137.

T.P. Rohrig and C. Moore, J. Anal. Toxicol., 27 (2003) 449.

M. Thevis, G. Opfermann and W. Scha¨ nzer, J. Anal. Toxicol., 27 (2003) 53.

W. Van Thuyne, P. Van Eenoo and F.T. Delbeke, J. Chromatogr. B, 785 (2003) 254.

C. Kollias-Baker and R. Sams, J. Anal. Toxicol., 26 (2002) 81.

N.K. Nair, V. Navaratnam and V. Rajananda, J. Chromatogr., 366 (1986) 363.

A. Sperling, J. Chromatogr., 538 (1991) 269.

C. Barnfield, S. Burns, D.L. Byrom and A.V. Kemmenoe, Forensic Sci. Int., 39 (1988) 107.

H. Neumann, Forensic Sci. Int., 44 (1990) 85.

H. Neumann, Forensic Sci. Int., 69 (1994) 7.

E. Kaa, Forensic Sci. Int., 64 (1994) 171.

A. Sibley, Forensic Sci. Int., 77 (1996) 159.

97 R.B. Myors, P.T. Crisp, S.V. Skopec and R.J. Wells, Analyst, 126 (2001) 679.

L. Stromberg, L. Lundberg, H. Neumann, B. Bobon, H. Huizer and N.W. van der Stelt, Forensic Sci. Int., 114 (2000) 67.

S.P. Sharma, B.C. Purkait and S.C. Lahiri, Forensic Sci. Int., 152 (2005) 235.

P. Esseiva, F. Anglada, L. Dujourdy, F. Taroni, P. Margot, E. Du Pasquier, M. Dawson, C. Roux and P. Doble, Talanta, 67 (2005) 360.

R. Brenneisen, F. Hasler and D. Wursch, J. Anal. Toxicol., 26 (2002) 561.

B.M. El-Haj, A.M. Al-Amri and H.S. Ali, Forensic Sci. Int., 145 (2004) 41.

J. Cartier, O. Gueniat and M.D. Cole, Sci. Justice, 37 (1997) 175.

I.S. Lurie and S.M. Carr, J. Liquid Chromatogr., 9 (1986) 2485.

I.S. Lurie and K. Mc Guiness, J. Liquid Chromatogr., 10 (1987) 2189.

P.A. Hays and I.S. Lurie, J. Liquid Chromatogr., 14 (1991) 3513.

A. Johnston and L.A. King, Forensic Sci. Int., 95 (1998) 47.

R. Dams, T. Benijst, W. Gunther, W. Lambert and A. De Leenheer, Anal. Chem., 74 (2002) 3206.

M.M.K. Reddy, P. Ghosh, S.N. Rasool, R.K. Sarin and R.B. Sashidhar, J. Chromatogr. A, 1088 (2005) 158.

F. Tagliaro and F.P. Smith, Trends Anal. Chem., 15 (1996) 513.

F. Tagliaro, S. Turina and F.P. Smith, Forensic Sci. Int., 77 (1996) 211.

I.S. Lurie, D.S. Anex, Y. Fintschenko and W.Y. Choi, J. Chromatogr. A, 924 (2001) 421.

I.S. Lurie, P.A. Hays, A.E. Garcia and S. Panicker, J. Chromatogr. A, 1034 (2004) 227.

I.S. Lurie, P.A. Hays and K. Parker, Electrophoresis, 25 (2004) 1580.

N. Anostos, N.W. Barrett, S.W. Lewis, J.R. Pearson and K.P. Kirkbridge, J. Forensic Sci., 50 (2005) 1039.

H. Neumann and M. Gloger, Chromatographia, 16 (1982) 261.

M. Chiarotti, N. Fucci and C. Furnari, Forensic Sci. Int., 50 (1991) 47.

A.F. Hernandez, A. Pla, J. Moliz, F. Gil, M.C. Gonzalvo and E. Villanueva, J. Forensic Sci., 37 (1992) 1276.

F. Besacier, H. Chaudron-Thozet, M. Rousseau-Tsangaris, J. Girard and A. Lamotte, Forensic Sci. Int., 85 (1997) 113.

T. Bora, M. Merdivan and C. Hamamci, J. Forensic Sci., 47 (2002) 959.

R. Dams, T. Benijst, W.E. Lambert, D.L. Massart and A.P. De Leenheer, Forensic Sci. Int., 123 (2001) 81.
J.G. Umans, T.S.K. Chiu, R.A. Lipman, M.F. Schulz, S.U. Shin and C.E. Inturrisi, J. Chromatogr., 233 (1982) 213.
C.E. Inturrisi, M.B. Bax, K.M. Foley, K. Schutz, S.U. Shin and R.W. Houde, New Engl. J. Med., 310 (1984) 1213.
A.J. Jenkins, R.M. Keenan, J.E. Heningfield and E.J. Cone, J. Anal. Toxicol., 18 (1994) 317.
E.J. Cone, B.A. Holicky, T.M. Grant, W.D. Darwin and B.A. Goldberger, J. Anal. Toxicol., 17 (1993) 327.
G. Skopp, B. Ganssmann, E.J. Cone and R. Aderjan, J. Anal. Toxicol., 21 (1997) 105.
E.J. Cone, P. Welch, J.M. Mitchell and B.D. Paul, J. Anal. Toxicol., 15 (1991) 1.
J. Fehn and G. Megges, J. Anal. Toxicol, 9 (1985) 134.
B.D. Paul, J.M. Mitchell, L.D. Mell and J. Irving, J. Anal. Toxicol., 13 (1989) 2.
R.W. Romberg and V.E. Brown, J. Anal. Toxicol., 14 (1990) 58.
D.C. Fuller and W.H. Anderson, J. Anal. Toxicol., 16 (1992) 315.
C. Meadway, S. George and R. Braithwaite, Forensic Sci. Int., 127 (2002) 136.
W.H. Soine, Med. Res. Rev., 6 (1986) 41.
C.L. O‘Neal and A. Poklis, J. Anal. Toxicol., 21 (1997) 427.
C.L. O’Neal and A. Poklis, Forensic Sci. Int., 95 (1998) 1.
N. McLachlan-Troup, G.W. Taylor and B.C. Trathen, Addict. Biol., 6 (2001) 223.
R. Brenneisen and F. Hasler, J. Forensic Sci., 47 (2002) 885.
H.J. Derks, K. Van Twillert, D.P. Pereboom-De Fauw, G. Zomer and J.G. Loeber, J. Chromatogr., 370 (1986) 173.
H. Hanisch and L.v. Meyer, J. Anal. Toxicol., 17 (1993) 48.
J. Gerostamoulos, K. Crump, I. McIntyre and O.H. Drummer, J. Chromatogr., 617 (1993) 152.
A.S. Low and R.B. Taylor, J. Chromatogr. B, 663 (1995) 225.
R. Dams, T. Benijst, W.E. Lambert and A.P. De Leenheer, J. Chromatogr. B, 773 (2002) 53.
P. Fernandez, C. Vasquez, L. Morales and A.M. Bermejo, J. Appl. Toxicol., 25 (2005) 200.
152 M.J. Bogusz, R.D. Maier, M. Erkens and U. Kohls, J. Anal. Toxicol., 25 (2001) 431.
F. Musshoff, J. Trafkowski and B. Madea, J. Chromatogr. B, 811 (2004) 47.
M. Katagi,M. Nishikawa,M. Tatsuno, A.Miki and H. Tsushihashi, J. Chromatogr. B, 751 (2001) 177.
M.G. Klous, E.J. Rook, M.J.X. Hillebrand, W. van den Brink, J. van Ree and J. Beijnen, J. Anal. Toxicol., 29 (2005) 564.
R.B. Taylor, A.S. Low and R.G. Reid, J. Chromatogr. B, 675 (1996) 213.
W.S. Wu and J.L. Tsai, Biomed. Chromatogr., 13 (1999) 216.
A.B. Wey and W. Thormann, J. Chromatogr. A, 916 (2001) 225.
J. Schuberth and J. Schuberth, J. Chromatogr., 490 (1989) 444.
F. Musshoff and T. Daldrup, Int. J. Leg. Med., 106 (1993) 107.
R. Wasels and F. Belleville, J. Chromatogr. A, 674 (1994) 225.
W.L. Wang, W.D. Darwin and E.J. Cone, J. Chromatogr. B, 660 (1994) 279.

B.A. Goldberger, E.J. Cone, T.M. Grant, Y.H. Caplan, B.S. Levine and J.E. Smialek, J. Anal. Toxicol., 18 (1994) 22.
M.R. Moeller and C. Mueller, Forensic Sci. Int., 70 (1995) 125.
J.G. Guillot, M. Lefebvre and J.P. Weber, J. Anal. Toxicol., 21 (1997) 127.
P.P. Rop, M. Fornaris, T. Salmon, J. Burle and M. Bresson, J. Anal. Toxicol., 21 (1997) 232.
B. Fryirs, M. Dawson and L.E. Mather, J. Chromatogr. B, 693 (1997) 51.
S. Pichini, I. Altieri, M. Pellegrini, P. Zuccaro and R. Pacifici, Mass Spectrom. Rev., 18 (1999) 119.
P. Zuccaro, R. Ricciarello, S. Pichini, R. Pacifici, I. Altieri, M. Pellegrini and G. D'Ascenzo, J. Anal. Toxicol., 21 (1997) 268.
M.J. Bogusz, R.D. Maier and S. Driessen, J. Anal. Toxicol., 21 (1997) 346.
M.J. Bogusz, R.D. Maier, M. Erkens and S. Driessen, J. Chromatogr. B, 703 (1997) 115.
M.J. Bogusz, J. Chromatogr. B, 748 (2000) 3.
N. Tyrefors, B. Hyllbrant, L. Ekman, M. Johansson and L. Langstro¨ m, J. Chromatogr. A, 729 (1996) 279.
W. Naidong, J.W. Lee, X. Jiang, M. Wehlin, J.D. Hulse and P.P. Lin, J. Chromatogr. B, 735 (1999) 255.
G. Schanzle, S. Li, G. Mikus and U. Hofmann, J. Chromatogr. B, 721 (1999) 55.
A. Dienes-Nagy, L. Rivier, G. Giroud, M. Augsburger and P. Mangin, J. Chromatogr. A, 854 (1999) 109.
M. Blanchet, G. Bru, M. Guerret, M. Bromet-Petit and N. Bromet, J. Chromatogr. A, 854 (1999) 93–108.
M.H. Slawson, D.J. Crouch, D.M. Andrenyak, D.E. Rollins, J.K. Lu and P.L. Bailey, J. Anal. Toxicol., 23 (1999) 468.
A. Cailleux, A. Le Bouil, B. Auger, G. Bonsergent, A. Turcant and P. Allain, J. Anal. Toxicol., 23 (1999) 620–624.
E.J. Rook, M.J.X. Hillebrand, H. Rosing, J.M. van Ree and J.H. Beijnen, J. Chromatogr. B, 824 (2005) 213.
M. Concheiro, A. de Castro, O. Quintela, M. Lopez-Rivadulla and A. Cruz, J. Chromatogr. B, 832 (2006) 81.
P. Kintz and N. Samyn, Unconventional samples and alternative matrices. in: M.J. Bogusz (Ed.), R.M. Smith (Series Ed.), Forensic science, handbook of analytical separations, Vol. 2. Elsevier Sciences, Amsterdam, 2000, pp. 459–488.
S. Pichini, I. Altieri, M. Pellegrini, R. Pacifici and P. Zuccaro, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol., 22 (1999) 873.
N. Samyn, G. De Boeck and A. Verstraete, J. Forensic Sci., 47 (2002) 1380.
A.J. Barnes, I. Kim, R. Schepers, E.T. Moolchan, L. Wilson, G. Cooper and C.H. Reid, C. Hand and M. A. Huestis,. J. Anal. Toxicol, 27 (2003) 402.
E. Vinner, J. Vignau, D. Thibault, X. Codaccioni, C. Brassart, L. Humbert and M. L'Hermitte, Forensic Sci. Int., 133 (2003) 57.
D. Montgomery, C. Plate, S.C. Alder, M. Jones, J. Jones and R.D. Christensen, J. Perinatol., 26 (2006) 11.

K. Wolff, M.J.S. Anderson and A.W. Hay, Ann. Clin. Biochem., 27 (1990) 482.
D.J. Dietzen, J. Koening and J. Turk, J. Anal. Toxicol., 19 (1995) 299.
J. Vecerkova, Soud. Lek., 42 (1997) 32.
R. Jain, R. Ray, B.M. Tripathi and C. Singh, Indian J. Pharmacol., 28 (1996) 220.
R. De la Torre, J. Segura, R. de Zeeuw and J. Williams, Ann. Clin. Biochem., 34 (1997) 339.
M. Zezulak, J.J. Snyder and S.B. Needleman, J. Forensic Sci., 38 (1993) 1275.
Z. Lin, P. Lafolie and O. Beck, J. Anal. Toxicol., 18 (1994) 129.
P.L. Hackett, L.J. Dusci, K.F. Kenneth and G.M. Chiswell, Therap. Drug Monit., 24 (2002) 652.
B.D. Paul, L.D. Mell, J.M. Mitchell, J. Irving and A.J. Novak, J. Anal. Toxicol., 9 (1985) 222.
B.H. Chen, E.H. Taylor and A.A. Pappas, J. Anal. Toxicol., 14 (1990) 12.
G.F. Grinstead, J. Anal. Toxicol., 15 (1991) 293.
J. Fenton, J. Mummert and M. Childers, J. Anal. Toxicol., 18 (1994) 159.
K.E. Brooks and N.B. Smiths, J. Anal. Toxicol., 20 (1996) 269.
L.A. Broussard, L.C. Presley, T. Pittman, R. Clouette and G.H. Wimbish, Clin. Chem., 43 (1997) 1029.
M.J. Bogusz, J. Anal. Toxicol., 21 (1997) 246.
E.J. Cone and W.D. Darwin, J. Chromatogr., 580 (1992) 43.
T. Gunnar, K. Ariniemi and P. Lillsunde, J. Mass Spectrom., 40 (2005) 739.
R.J. Osborne, S.P. Joel, D. Trew and M.L. Slevin, Clin. Pharmacol. Ther., 47 (1990) 12.
R.T. Penson, S.P. Joel, K. Bakhshi, S.J. Clark, R.M. Langford and M.L. Slevin, Clin. Pharmacol. Ther., 68 (2000) 667.
M. Barberi-Heyob, J.R. Merlin, I. Krakowski, C. Kettani, E. Collin and P. Poulain, Bull. Cancer, 78 (1991) 1063.
J.L. Mason, S.P. Ashmore and A.R. Aitkenhead, J. Chromatogr. B, 570 (1991) 191.
R.K. Portenoy, E. Khan, M. Layman, J. Lapin, M.G. Malkin, K.M. Foley, H.T. Thaler, D.J. Cerbone and C.E. Inturrisi, Neurology, 41 (1991) 1457.
P. Joel, R.J. Osborne and M.L. Slevin, J. Chromatogr., 430 (1988) 394.
Y. Rothsteyn and B. Weingarten, Ther. Drug Monit., 18 (1996) 179.
P.A. Glare, T.D. Walsh and C.E. Pippenger, Ther. Drug Monit., 13 (1991) 226.
C.E. Hartley, M. Green, M. Quinn and M.I. Levene, Biomed. Chromatogr., 7 (1993) 34.
M.J. Bogusz, R.D. Maier, K.D. Kru¨ ger and U. Kohls, J. Anal. Toxicol., 22 (1998) 549.
M. Zheng, K.M. McErlane and M.C. Ong, J. Pharmaceut. Biomed. Anal., 16 (1988) 971.
W.Z. Shou, Y.L. Chen, A. Eerkes, Y.Q. Tang, L. Magis, X. Jiang and W. Naidong, Rapid Comm. Mass Spectrom., 16 (2002) 1613.
D. Whittington and E.D. Kharash, J. Chromatogr. B, 796 (2003) 95.
C.M. Murphy and M. Huestis, J. Mass Spectrom., 40 (2005) 1412.
R. Kaushik and W.R. LaCourse, Anal. Chim. Acta, 556 (2006) 255.
R. Aderjan, S. Hofmann, G. Schmitt and G. Skopp, J. Anal. Toxicol., 19 (1995) 163.
S. Kerrigan, D. Honey and G. Baker, J. Anal. Toxicol., 28 (2004) 529.
S. Cengiz, O¨ . Ulukan, I. Ates and H. Tugcu, Forensic Sci. Int., 156 (2006) 91.
M.L. Goff, W.A. Brown, K.A. Hewadikaram and A.I. Omori, J. Forensic. Sci., 36 (1991) 537.

F. Introna, C. Lo Dico, Y.H. Caplan and J.E. Smialek, J. Forensic Sci., 35 (1990) 118.
P. Kintz, V. Cirimele, Y. Edel, C. Jamey and P. Mangin, J. Forensic Sci., 39 (1994) 1497.
V. Hedouin, B. Bourel, L. Martin-Bouyer, A. Becart, G. Tournel, M. Devaux and D. Gosset, J. Forensic Sci., 44 (1999) 351.
V. Hedouin, B. Bourel, A. Becart, G. Tournel, M. Devaux, M.L. Goff and D. Gosset, J. Forensic Sci., 46 (2001) 12.
B. Bourel, L. Fleurisse, V. Hedouin, J.C. Cailliez, C. Creusy, D. Gosset and M.L. Goff, J. Forensic Sci., 46 (2001) 596.
B. Bourel, G. Tournel, V. Hedouin, M.L. Goff and D. Gosset, J. Forensic Sci., 46 (2001) 600.
C.P. Campobasso, M. Gherardi, M. Caligara, L. Sironi and F. Introna, Int. J. Legal Med., 118 (2004) 210.
G. Skopp, K. Klinder, L. Potsch, G. Zimmer, R. Lutz, R. Aderjan and R. Mattern, Forensic Sci. Int., 95 (1998) 99.
M. Balikova and V. Maresova, Forensic Sci. Int., 94 (1998) 201.
R. Aderjan and G. Skopp, Ther. Drug Monit., 20 (1998) 561.
H. Seno, H. Hattori, S. Kurono, T. Yamada, T. Kumazawa, A. Ishii and O. Suzuki, J. Chromatogr. B, 673 (1995) 189.
U. Hofmann, M.F. Fromm, S. Sohnson and G. Mikus, J. Chromatogr. B., 663 (1995) 59.
P. Kintz, A. Tracqui and P. Mangin, Int. J. Legal Med., 104 (1991) 177.
H. Sachs, R. Denk and I. Raff, Int. J. Legal Med., 105 (1993) 247.
D. Wilkins, D.E. Rollins, J. Seaman, H. Haughey, G. Krueger and R.L. Foltz, J. Anal. Toxicol., 19 (1995) 269.
S.P. Gygi, D.G. Wilkins and D.E. Rollins, J. Anal. Toxicol., 19 (1995) 387.
M. Balikova, V. Maresova and V. Habrdova, J. Chromatogr. B, 752 (2001) 179.
C.P. Verwey-Van Wissen, P.M. Koopman-Kimenai and T.B. Vree, J. Chromatogr., 570 (1991) 309.
S.S. Mohammed, M. Butschkau and H. Derendorf, J. Liquid Chromatogr., 16 (1993) 2325.
J.O. Svensson, Q.Y. Yue and J. Sa¨ we, J. Chromatogr. B, 674 (1995) 49.
H. He, S.D. Shay, Y. Caraco, M. Wood and A.J. Wood, J. Chromatogr. B, 708 (1998) 185.
P. Lafolie, O. Beck, Z. Lin, F. Albertioni and L. Boreus, J. Anal. Toxicol., 20 (1996) 541.
L.C. Kirkwood, R.L. Nation and A.A. Somogyi, J. Chromatogr. B, 701 (1997) 129.
E. Hufschmid, R. Theurillat, C.H.Wilder-Smith andW. Thormann, J. Chromatogr. B, 678 (1996) 43.
A.B. Wey, J. Caslavska and W. Thormann, J. Chromatogr. A, 895 (2000) 133.
S.L. Walsh, K.L. Preston, G.E. Bigelow and M.L. Stitzer, J. Pharmacol. Exp. Ther., 274 (1995) 361.
258 L. Amass, J.B. Kamien and S.K. Mikulich, Drug Alcohol Depend., 58 (2000) 143.
P. Kintz and P. Marquet (Eds.), Buprenorphine therapy of opiate addiction. Humana Press, Totowa, USA, 2002.
G. Vidal-Trecan, I. Vareson, N. Nabet and A. Boisonnas, Drug Alcohol Depend., 69 (2003) 175.
L. Debrabandere, M. Van Bouven and P. Daenens, J. Forensic sci., 40 (1995) 250.

V. Cirimele, P. Kintz, S. Lohner and B. Ludes, J. Anal. Toxicol., 27 (2003) 103.
M. Bo¨ ttcher and O. Beck, J. Anal. Toxicol., 29 (2005) 769.
V. Cirimele, S. Etienne, M. Villain, B. Ludes and P. Kintz, Forensic Sci. Int., 143 (2004) 153.
E.J. Cone, C.W. Gorodetzky, D. Yousefnejad and W.D. Darwin, J. Chromatogr., 335 (1985) 291.
K.A. Hadidi and J.S. Oliver, Int. J. Med. Leg., 111 (1998) 165.
J.J. Kuhlman, J. Magluilo Jr., E.J. Cone and B. Levine, J. Anal. Toxicol., 20 (1996) 229.
A.M. Lisi, R. Kazlauskas and G.J. Trout, J. Chromatogr. B, 692 (1997) 67.
E.J. Cone, C.W. Gorodetzky, W.D. Darwin and W.F. Bunchwald, J. Pharm. Sci., 73 (1984) 243.
L. Debrabandere, M. Van Boven and P. Daenens, J. Forensic Sci., 37 (1992) 82.
P. Kintz, J. Anal. Toxicol., 17 (1993) 443.
P. Kintz, A. Tracqui and P. Mangin, J. Forensic Sci. Soc., 34 (1994) 95.
H. Hoja, P. Marquet, B. Verneuil, H. Lofti, J.L. Dupuy and G. Lachatre, J. Anal. Toxicol., 21 (1997) 160.
A. Tracqui, P. Kintz and P. Mangin, J. Forensic Sci., 42 (1997) 111.
D.E. Moody, J.D. Laycock, A.C. Spanbauer, D.J. Crouch, R.L. Foltz, J.L. Josephs, L. Amass and W.K. Bickel, J. Anal. Toxicol., 21 (1997) 406.
D.E. Moody, M.H. Slawson, E.C. Strain, J.D. Laycock, A.C. Spanbauer and R.L. Foltz, Anal. Biochem., 306 (2002) 31.
J.M. Gaulier, P. Marquet, E. Lacassie, J.L. Dupuy and G. Lachatre, J. Forensic Sci., 45 (2000) 226.
A. Polettini and M.A. Huestis, J. Chromatogr. B, 754 (2001) 447.
C.M. Murphy and M.A. Huestis, J. Mass Spectrom., 40 (2005) 70.
A. Ceccato, R. Klinkenberg, P. Hubert and B. Streel, J. Pharm. Biomed. Anal., 32 (2003) 619.
R. Kronstrand, T.G. Selden and M. Josefsson, J. Anal. Toxicol., 27 (2003) 464.
D. Grimm, E. Pauly, J. Poschl, O. Linderkamp and G. Skopp, Ther. Drug Monit., 27 (2005) 526.
V.P. Dole, . In: A. Tagliamonte, L. Maremmani (Eds.), Methadone maintenance. Comes of age, Drug addiction and related clinical problems, Springer Verlag, Heidelberg–Wien–New York, 1995, pp. 45–63.
R.G. Newman, . In: A. Tagliamonte, L. Maremmani (Eds.), The pharmacological rational for methadone treatment of narcotic addiction, Drug addiction and related clinical problems, Springer Verlag, Heidelberg-Wien-New York, 1995, pp. 109–136.
288 R. La Harpe and O. Fryc, Arch. Kriminol., 196 (1995) 24.
A. Heinemann, J. Ribbat, K. Pu¨ schel, S. Iwersen and A. Schmoldt, Rechtsmedizin, 8 (1998) 55.
N. Chikhi-Chorfi, H. Galons, C. Pham-Huy, M. Thevenin, J.M. Warnet and J.R. Claude, Chirality, 13 (2001) 187.
S. George, S. Parmar, C. Meadway and R.A. Braithwaite, Ann. Clin. Biochem., 37 (2000) 350.
L. Moore, J. Wicks, V. Spiehler and R. Holgate, J. Anal. Toxicol., 25 (2001) 520.

N. De Giovanni, N. Fucci, M. Chiarotti and S. Scarlata, J. Chromatogr. B, 773 (2002) 1.
G. Cooper, L. Wilson, C. Reid, D. Baldwin, C.H and and V. Spiehler, J. Forensic Sci., 50 (2005) 928.
M. ElSohly, S. Feng and T.P. Murphy, J. Anal. Toxicol., 25 (2001) 40.
P. Kintz, P. Mangin, A.A. Lugniert and A.J. Chaumont, J. Toxicol. Clin. Exp., 10 (1990) 15.
L.D. Baugh, R.H. Liu and A.S. Walia, J. Forensic Sci., 36 (1991) 548.
N. Schmidt, R. Sittl, K. Brune and G. Geisslinger, Pharm. Res., 10 (1993) 441.
M.E. Alburges, W. Huang, R.L. Foltz and D.E. Moody, J. Anal. Toxicol., 20 (1996) 362.
D.G. Wilkins, P.R. Nasagawa, S.P. Gygi, R.L. Foltz and D.E. Rollins, J. Anal. Toxicol., 20 (1996) 355.
301 G.A.A. Cooper and J.S. Oliver, J. Anal. Toxicol., 22 (1998) 389.
D.W. Lachenmeier, L. Kroener, F. Musshoff and B. Madea, Rapid Commun. Mass Spectrom., 17 (2003) 472.
303 F.J. Couper, K. Chopra and M.L. Pierre-Louis, Forensic Sci. Int., 153 (2005) 71.
P. Kintz, M. Villain, V. Dumestre-Toulet, B. Capolaghi and V. Cirimele, Ther. Drug Monit., 27 (2005) 741.
L.M. Stolk, S.M. Coenradie, B.J. Smit and H.L. van As, J. Anal. Toxicol., 21 (1997) 154.
O. Beck, L.O. Boreus, P. Lafolie and G. Jacobson, J. Chromatogr., 570 (1991) 198.
N. Schmidt, K. Brune and G. Geisslinger, J. Chromatogr., 583 (1992) 195.
R.L. Norris, P.J. Ravenscroft and S.M. Pond, J. Chromatogr. B, 661 (1994) 346.
K. Kristensen, H.R. Angelo and T. Blemmer, J. Chromatogr. A, 666 (1994) 283.
S. Rudaz and J.L. Veuthey, J. Pharm. Biomed. Anal., 14 (1996) 1271.H.R. Angelo, O. Beck and K. Kristensen, J. Chromatogr. B, 724 (1999) 35.
P. Kintz, H.P. Eser, A. Tracqui,M.Moeller, V. Cirimele and P. Mangin, J. Forensic Sci., 42 (1997)
291.
D. Ortelli, S. Rudaz, A.F. Chevalley, J.J. Deglon, L. Balant and J.L. Veuthey, J. Chromatogr. A,
871 (2000) 163.
O. Dale, C. Hoffer, P. Sheffels and E.D. Kharasch, Clin. Pharmacol. Ther., 72 (2002) 536.
S. Souverain, C. Eap, J.L. Veuthey and S. Rudaz, Clin. Chem. Lab. Med., 41 (2003) 1615.
H.R. Liang, R.L. Foltz, M. Meng and O.P. Bennett, J. Chromatogr. B, 806 (2004) 191.
D. Whittington, P. Sheffels and E.D. Kharash, J. Chromatogr. B, 809 (2004) 313.
M.L. Etter, S. George, K. Graybiel, J. Eichhorst and D.C. Lehotay, Clin. Biochem., 38 (2005) 1095.
S. Molteni, J. Caslavska, D. Allemann and W. Thormann, J. Chromatogr. B, 658 (1994) 355.
W. Thormann, M. Lanz, J. Caslavska, P. Siegenthaler and R. Portmann, Electrophoresis, 19 (1998) 57.
J. Esteban, M. de la Cruz Pellin, C. Gimeno, J. Barril, E. Mora, J. Gimenez and E. Vilanova, Toxicol. Lett., 15 (2004) 243.
T. Kelly, P. Doble and M. Dawson, Electrophoresis, 24 (2003) 2106.
C. Merslavic and L. Zupancic-Kraj, J. Chromatogr. B, 693 (1997) 222.

K.E. Goeringer, B.K. Logan and G.D. Christian, J. Anal. Toxicol., 21 (1997) 529.
K.J. Lusthof and P.G.M. Zweipfenning, J. Anal. Toxicol., 22 (1998) 260.
B. Levine, V. Ramcharitar and J.E. Smialek, J. Anal. Toxicol., 21 (1997) 43.
G. Sticht, P. Schmidt and H. Ka¨ ferstein, Rechtsmedizin, 7 (1997) 127.
V. Gambaro, C. Benvenuti, L. De Ferrari, L. Dell'Acqua and F. Fare, Farmaco, 58 (2003) 947.
H.J. Leis, G. Fauler and W. Windischhofer, J. Chromatogr. B, 804 (2004) 369.
Y.F. Sha, S. Shen and G.L. Duan, J. Pharm. Biomed. Anal., 37 (2005) 143.
K.A. Hadidi, J.K. Almasad, T. Al-Nsour and S. Abu-Ragheib, Forensic Sci. Int., 135 (2003) 129.
M. Nobilis, J. Pastera, P. Anzenbacher, D. Svoboda, J. Kopecky and F. Perlik, J. Chromatogr. B, 681 (1996) 177.
M. Nobilis, J. Kopecky, J. Kvetina, J. Chladek, Z. Svoboda, V. Vorisek, F. Perlik, M. Pour and J. Kunes, J. Chromatogr. A, 949 (2002) 11.
S.J. Juzwin, D.C. Wang, N.J. Anderson and F.A. Wong, J. Pharm. Biomed. Anal., 22(2) (2000) 469.
W.N. Wu, L.A. McKown and S. Liao, Xenobiotica, 32 (2002) 411.
L.M. Zhao, X.Y. Chen, J.J. Cui, M. Sunita and D.F. Zhong, Yao Xue Xue Bao, 39 (2004) 458.
E. Frankus, E. Friderichs, S.M. Kim and G. Osterloh, Arzneim. Forsch., 28 (1978) 114.
B. Elsing and G. Blaschke, J. Chromatogr., 612 (1993) 223.
A. Ceccato, P. Chiap, P. Hubert and J. Crommen, J. Chromatogr. B, 698 (1997) 161.
A. Ceccato, F. Vanderbist, J.Y. Pabst and B. Streel, J. Chromatogr. B, 748 (2000) 65.
U.B. Soetebeer, M.O. Schierenberg, H. Schulz, G. Grunefeld, P. Andresen and G. Blaschke, J. Chromatogr. B, 745 (2000) 271.
U.B. Soetebeer, M.O. Schierenberg, H. Schulz, P. Andresen and G. Blaschke, J. Chromatogr. B, 765 (2001) 3.
S. Rudaz, S. Cherkaoui, P. Dayer, S. Falani and J.L. Veuthey, J. Chromatogr. A, 868 (2000) 295.
P. Lehtonen, H. Siren, I. Ojanpera and R. Kostiainen, J. Chromatogr. A, 1041 (2004) 227.
J. Vecerkova, Criminalistics, 25 (1992) 216.
K.L. Sees, M.E. DiMarino, N.K. Ruediger, C.T. Sweeney, S. Shiffman and J. Pain Palliat, Care
Pharmacother., 19 (2005) 13.
B.C. Wolf, W.A. Lavezzi, L.M. Sullivan and L.M. Flanagan, J. Forensic Sci., 50 (2005) 192.
J.M. Abadie, K.H. Allison, D.A. Black, J. Garbin, A.J. Saxon and D.D. Bankson, J. Anal. Toxicol., 29 (2005) 825.
349 R.C. Backer, J.R. Monforte and A. Poklis, J. Anal. Toxicol., 29 (2005) 675.
V.R. Spiehler, L. DeCicco, J.R. McCutcheon, T. Kupiec and P. Kemp, J. Forensic Sci., 40 (2004) 621.
R.P. Kapil, P.K. Padovani, S.Y. King and G.N. Lam, J. Chromatogr., 577 (1992) 283.
C.M. Moore, D. Deitermann, D. Lewis and J. Leikin, J. Anal. Toxicol., 10 (1995) 514.

J. Jones, K. Tomlinson and C. Moore, J. Anal. Toxicol., 26 (2002) 171.
N.L. Le, A.E. Reiter, K. Tomlinson, J. Jones and C. Moore, J. Anal. Toxicol., 29 (2005) 54.
R. Meatherall, J. Anal. Toxicol., 29 (2005) 301.
A.W. Wright, M.L. Nocente and M.T. Smith, Life Sci., 63 (1998) 401.
Y.L. Chen, G.D. Hanson, X. Jiang and W. Naidong, J. Chromatogr. B, 769 (2002) 55.
E. Bostrom, B. Jansson, M. Hammarlund-Udenaes and U.S. Simmonsson, Rapid Commun. Mass Spectrom., 18 (2004) 2565.
L.E. Edinboro, R.C. Backer and A. Poklis, J. Anal. Toxicol., 29 (2005) 704.
S.E. Edwards and M.T. Smith, J. Chromatogr. B, 814 (2005) 241.
O. Cheremina, I. Bachmakov, A. Neubert, K. Brune, F. Maertin and B. Hinz, Biomed. Chromatogr. (2005) online.
362 A.B. Wey and W. Thormann, J. Chromatogr. B, 770 (2002) 191.
A. Baldacci, J. Caslavska, A.B. Wey and W. Thormann, J. Chromatogr. A, 1051 (2004) 273.
R.C. Baselt, Disposition of toxic drugs and chemicals in man, (5th ed). Chemical Toxicology Institute, Foster City, California, 2000, pp. 353–356.
R. Kronstrand, H. Druid, P. Holmgren and J. Rajs, Forensic Sci. Int., 88 (1997) 185.
P. Kintz, M. Villain, V. Dumestre and V. Cirimele, Forensic Sci. Int., 153 (2005) 153.
T. Tobin, S. Kwiatkowski, D.S. Watt, H.H. Tai, C.L. Tai, W.E. Woods, J.P. Goodman, D.G. Taylor, T.J. Weckman and J.M. Yang, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 63 (1989) 129.
H. Ka¨ ferstein and G. Sticht, Forensic Sci. Int., 113 (2000) 353.
V. Watts and Y. Caplan, J. Anal. Toxicol., 12 (1988) 246.
H. Ohta, S. Suzuki and K. Ogasawara, J. Anal. Toxicol., 23 (1999) 280.
F.M. Esposito and C.L. Winek, J. Forensic Sci., 26 (1991) 86.
A. Szeitz, K.W. Riggs and C. Harvey-Clark, J. Chromatogr. B, 675 (1996) 33.
B. Fryirs, A. Woodhouse, J.L. Huang, M. Dawson and L.E. Mather, J. Chromatogr. B, 688 (1997)
79.
H. Sachs, M. Uhls, G. Hege-Scheuning and E. Schneider, Int. J. Leg. Med., 109 (1996) 213.
D.T. Anderson and J.J. Muto, J. Anal. Toxicol., 24 (2000) 627.
J.J. Kuhlman Jr., R. McCauley, T.J. Valouch and G.S. Behonick, J. Anal. Toxicol., 27 (2003) 499.
P.K. Lilleng, L.I. Mehlum, L. Bachs and I. Morild, J. Forensic Sci., 49 (2004) 1364.
A.M. Tharp, R.E. Winecker and D.C. Winston, Am. J. Forensic Med. Pathol., 25 (2004) 178.
379 A. Poklis and R. Backer, J. Anal. Toxicol., 28 (2004) 422.
C. Paradis, C. Dufresne, M. Bolon and R. Boulieu, Ther. Drug Monit., 24 (2002) 768.
N.F. Van Nimmen, K.L. Poels and H.A. Veulemans, J. Chromatogr. B, 804 (2004) 375–387.
N.F. Vam Nimmen and H.A. Veulemans, J. Chromatogr. A, 1035 (2004) 249.
W.Z. Shou, X. Jiang, B.D. Beato and W. Naidong, Rapid Commun. Mass Spectrom., 15 (2001) 466.
D.E. Koch, R. Isaza, J.W. Carpenter and R.P. Hunter, J. Pharm. Biomed. Anal., 34 (2004) 577.

N.H. Huynh, N. Tyrefors, L. Ekman and M. Johansson, J. Pharm. Biomed. Anal., 37 (2005) 1095.
J. Martens-Lobenhoffer, J. Chromatogr. B., 769 (2002) 227.
L. Palleschi, L. Lucentini, E. Ferretti, F. Anastasi, M. Amoroso and G. Draisci, J. Pharm. Biomed.
Anal., 32 (2003) 329.
S.R. Edwards, C.F. Minto and L.E. Mather, Br. J. Anesth., 88 (2002) 94.
A.F. Lehner, P. Almeida, J. Jacobs, J.D. Harkins, W. Karpiesiuk, W.E. Woods, L. Dirikolu, J.M.
Bosken, W.G. Carter, J. Boyle, C. Holtz, T. Heller, C. Nattrass, M. Fisher and T. Tobin, J. Anal.Toxicol., 24 (2000) 309.
M. Thevis, H. Geyer, D. Bahr and W. Schanzer, Eur. J. Mass Spectrom., 11 (2005) 419.
T. Breindahl and K. Andreasen, J. Chromatogr. B, 736 (1999) 103.
I. Sundstrom, U. Bondesson and M. Hedel and, J. Chromatogr. B, 763 (2001) 121.
M.H. Andraus and M.E. Siquera, J. Chromatogr. B, 704 (1997) 143.
H. Bagheri, A. Es-haghi and M.R. Rouini, J. Chromatogr. B, 818 (2005) 147.
D.L. Kuhlenbeck, T.H. Eichold, S.H. Hoke, T.R. Baker, R. Mensen and K.R. Wehmeyer, Eur. J. Mass Spectrom., 11 (2005) 199.
Fisher, B. A. J. Techniques of crime scene investigation / Barry A.J. Fisher ; 7th ed., CRC Press Boca Raton London New York Washington, D.C., 2004.
Eckert W. G. Introduction to Forensic Sciences. 2nd Ed. CRC Press Boca Raton New York, London Tokyo, 1997.
Shakhashiri, Bassam, Chemical Demonstrations, Vol. 1, U. Wisconsin Press, 1983, p. 156.
Summerlin, L, Ealy, J, Chemical Demonstrations, American Chemical Society, 1985, p. 138.
Drochioiu,G., Oniscu, C., Gradinaru, R., and Murariu, Manuela. The biostructural theory versus the chemiosmotic theory. *Roum. Biotechnol. Lett.*, 9(2) 1579-1586, 2004;
Drochioiu, G. Eugen Macovschi's concept of biostructure and its current development. In *Life and mind. In search of the physical basis.* (S. Savva ed.) Trafford Publ., Canada, USA, Ireland & UK, 2006, pp. 43-60; ISBN: 1-4251-1090-8

Partea a-II-a

Separatologie judiciara

Ionel Mangalagiu

Ramona Danac **Costel Moldoveanu** **Gheorghita Zbancioc**

I. INTRODUCERE

Drogurile (aici incluzind si medicamentele cu potential de drog) au constituit dintodeauna o clasa de compusi de mare risc pentru oameni. Fie ca sunt procurate licit sau ilicit, consumul abuziv de droguri constituie o problema majora a societatii umane actuale. Potrivit raportului World Drug Report 2007, utilizarea abuzului de droguri (Drug Abuse, DA) pare sa se fi stabilizat in ultimii ani, dar circa 200 de milioane de oameni incă mai folosesc droguri ilicite in fiecare an.

Drogurile care produc dependenta consumatorilor, care pot reduce penal responsabilitatea unui inculpat, sau care poate reduce aptitudinile de a desfasura anumite activitati, trebuiesc monitorizate constant in organismul uman, cel mai adesea in fluide si tesuturi. Aceleasi aspecte sunt vizate si in controalele antidoping la sportivi, deoarece folosirea sau abuzul de medicamente care stimuleaza masa musculara, pentru a creste nivelul de performanta, duce la tulburari secundare nedorite cum ar fi reducerea in greutate, surmenaj, boli psihice, etc.

In plus, in ultimele decenii, s-a dovedit ca atit drogurile in sine cit si produsii lor de metabolizare constitue o sursa de poluare deloc de neglijat a mediului inconjurator.

In toxicologia medico-legala, separarea, identificarea si dovedirea structurii diverselor substante, a capatat o importanta hotaritoare atit in cazul drogurilor ilegale cit si in cazul otravurilor (introduse accidental sau cu scopuri criminale). In prezenta exisat o adevarata strategie de screening toxicologica, deoarece exista citeva mii de droguri sau de pesticide care trebuiesc sa fie luate in considerare atunci cind se efectueaza o analiza.

In ultimii ani, GC (cromatografia de gaze), MS-ul (spectroscopia de masa) si tandemul GC-MS-ul au cunoscut o dezvoltare spectaculoasa devenind practic metodele cele mai importante, performante si uzuale in criminologie, permitind atit separarea cit si identificare diverselor clase de droguri. Pretratamentul

diverselor tipuri de probe utilizate in toxicologia medico-legala a condus si la aprofundarea cunostintelor in ceea ce priveste tehnicele analitice utilizate in acest sens: extractie, cromatografie in start subtire, derivatizare.

Scopul acestui manual este acela de a aduna intr-un tot unitar atit notiunile teoretice de baza din GC-MS cit si aplicatile acestor tehnici in medicina judiciara. Un accent deosebit a fost pus in cazul aplicatiilor in medicina judiciara pe informatiile din ultimile doua decenii, cu precadere din ultimii 10 ani.

In acest manual sunt descrise cu precadere principiile de baza, aparatura precum si tehnicile si metodele de baza utilizate in toxicologia medico-legala. Spectrometrul de masa, in diferitele sale forme constructive, este acum parte integranta din fiecare laborator criminalistic. Practic, GC-MS in modul de functionare cu ionizare electronica (EI), constituie la ora actuala metoda de referinta pentru confirmarea testelor pozitive in analizele toxicologice folosite in medicina judiciara. Metodele GC-MS in modul de functionare cu ionizare electronica (EI) prezinta avantajul ca sunt reproductibile si deja sunt librarii de spectre care permite o identificare rapida a diverselor droguri, toxice, metaboliti, etc. Asa spre exemplu determinarea morfinei si cocainei din probele de singe prin GC-MS este in prezent un procedeu de rutina, complet automatizat, care dureaza circa 2 ore, si este recunoscut atit in medicina judiciara cit si in controlul antidoping. Numarul de posibilelor aplicatii medico-legale ale spectroscopia de masa este limitată doar de imaginația expertului medico-legal.

II. CROMATOGRAFIA DE GAZE

II.1. Introducere

II.2. Concepte de baza

II.3. Componentele cromatografului de gaze

II.3.1. Gazul purtator

II.3.2. Sistemul de introducere a probelor

II.3.3. Temperatura coloanei

II.3.4. Detectori utilizați în cromatografia de gaze

II. CROMATOGRAFIA DE GAZE

II.1. Introducere

Metodele chimice de analiză care să prezinte o selectivitate şi specificate ridicată sunt în general foarte puține. Separarea analitului de potențialii interferenți dintr-o probă este adesea necesară, dar nu este considerată ca un pas vital în procedurile analitice.

Fără a greşi, putem spune că cea mai performantă metodă de separare utilizată în analizele chimice este cromatografia, metodă care îşi găseşte aplicații în toate domeniile ştiințifice.

Aplicațiile cromatografiei au avut o creştere explozivă în ultimii 40 de ani, aceasta nefiind datorată în exclusivitate doar apariției mai multor tipuri noi de tehnici cromatografice, ci şi datorită necesității descoperirii unor metode foarte performante pentru caracterizarea amestecurilor chimice foarte complexe.

Cromatografia cuprinde diverse şi importante metode de analiză care permit chimistului să separe compuşi cu structură asemănătore din amestecuri complexe. Multe din aceste separări sunt imposibil de realizat prin alte procedee de separare.

În toate metodele de separare cromatografică, proba este dizolvată în faza mobilă, care poate fi gaz, lichid sau fluid. Faza mobilă este apoi trecută peste o fază staționară nemiscibilă, care este fixată în interiorul unei coloane sau pe o suprafață solidă. Cele două faze sunt alese în aşa fel încît componenții probei să se distribuie între acestea la variația temperaturii. Acei compuşi care sunt puternic reținuți de faza staționară se vor deplasa mult mai încet în comparație cu viteza de curgere a fazei mobile. În contrast , componeții care sunt mai slab reținuți vor traversa faza staționară mai repede. Ca o consecința a acestor diferențe de mobilitate, componeții probei vor separa în benzi discrete cate pot fi apoi analizate calitativ şi /sau cantitativ.

Metodele cromatografice pot fi clasificate după două direcții. Prima clasificare se poate face în funcție de fenomenul fizic prin care cele două faze sunt aduse în contact:

- cromatografia pe coloană, în acest caz faza staționară este plasată în interiorul unor tuburi cu diametre foarte mici, iar faza mobilă este forțată să treverseze coloana fie prin diferență de presiune fie datorită gravitației;

- cromatografie planară, cînd faza staționară este depusă pe un suport plat sau în capilarele unei hîrtii speciale. În acest caz faza mobilă se deplasează peste faza staționară sub influența forțelor capilare sau a gravitației.

O clasificare mult mai riguroasă a metodelor cromatografice are la bază tipul fazelor mobile şi a fazelor staționare şi tipul de echilibru care este implicat în transferul solutului între cele două faze. Pe baza acestui criteriu cromatografia se împarte în trei mari categorii generale:

-cromatografia de gaze;

- croamtografia de lichide;

- cromatografia fluidelor supercritice.

În sens larg, cromatografia de gaze este considerată a fi o tehnică puternică si larg utilizată, comparativ cu alte tehnici instrumentale. Cînd este folosită corespunzător, cromatografia de gaze poate da informații calitative şi cantitative despre compuşii individuali dintr-o probă. Cromatografia este în esență o metodă fizică de separare, în care componenții unei probe sunt separați în funcție de distribuția acestora între două faze, una staționară şi una mobilă. Separarea compuşilor este practic realizată în funcție de volatilitataea şi structura lor. Mulți compuşi chimici nu pot fi analizați prin cromatografia de gaze datorită proprietăților lor fizice şi chimice.

Sistemul gaz cromatografic poate monitoriza doar acei compuşi care prezintă o volatilitate apreciabilă la o temperatură cuprinsă între 350-400 ^{0}C. De asemenea, aceşti compuşi trebuie să fie stabili la temperaturi înalte şi totodată, trecerea lor rapidă în stare de vapori să nu conducă la degradarea sau reacția lor cu

alţi compuşi. Uneori structura compuşilor şi masele lor moleculare pot fi utilizate ca indicatori potenţiali, în ceea ce priveşte analiza lor prin cromatografia de gaze.

O caracteristică de bază a compuşilor chimici, care este de o mare importanţa pentru acest tip de analiză, este volatilitatea lor. Compuşii cu o volatilitate scăzută nu pot fi analizaţi prin această tehnică instrumentală, aceştia neputînd fi aduşi în stare de vapori fără a exista posibilitatea degradării termice a lor. Punctele de fierbere ale compuşilor studiaţi, nu reprezintă întotdeauna un factor care să caracterizeze volatilitatea acestora. Compuşii pot avea puncte de fierbere ridicate, dar totodată pot fi şi analizaţi prin cromatografia de gaze. În general, masa moleculară şi polaritatea compuşilor sunt considerate în vederea stabilirii posibilităţii studierii acestora cu sistemul gaz cromatografic (compuşii nepolari cu masă moleculară mare pot fi mult mai volatili decît compuşii polari cu masă moleculară mică).

Astfel hidrocarburile cu masa moleculară peste 500 uam sunt în mod obişnuit analizate prin sisteme standard GC, iar cele cu masa moleculară peste 1400 uam au putut fi analizate cu uşurintă prin echiparea sistemelor GC cu coloane speciale.

Prezenţa grupelor funcţionale polare (-OH, $-NH_2$), de multe ori conduce la scăderea volatilităţii compuşilor. Cîţiva compuşi cu molecule mici (aminoacizi, zaharide) nu pot fi analizaţi cu prea mare uşurinţă prin GC datorită numărului mare a grupelor polare.

Urmărind aceaşi linie se poate arăta că, în principiu compuşii anorganici nu pot fi analizaţi prin tehnica gaz-cromatografică, aceasta datorită faptului că metalele şi sărurile nu prezintă volatilitatea cerută de acestă metodă de analiză. În particular se cunosc doar cîţiva compuşi organometalici caracterizaţi de o volatilitate crescută care se pot analiza prin cromatografie de gaze.

În ultimii ani au apărut noi direcţii în vederea aplicării cromatografiei de gaze care au schimbat caracterul informaţiilor cromatografice. Astfel, noile descoperiri din tehnologia coloanelor, au pus la punct coloane cu un diametru

foarte mic, ceea ce a condus practic la o creştere semnificativă a rezoluției cromatogramelor într-un timp de analiză foarte scurt.

Cromatografia de gaze a fost sistematic utilizată în ultimii 20 ani pentru analiza compuşilor din amestecuri complexe în diferite domenii de cercetare (industria chimică, farmaceutică, petrochmică), şi a devenit în ultimul timp o tehnică indispensabilă în analizele poluanților chimici de natură organică, din mediul înconjurător.

II.2. Concepte de baza

Informațiile obținute de la o analiză sunt conținute în cromatogramă, care este o înregistrare grafică, a concentrației sau profilului de masă a componenților din probă funcție de mişcarea fazei mobile prin coloană.

Informația dată numai de cromatogramă include: o măsură a complexității probei bazată pe numărul de picuri observate; identificarea calitativă a componenților din probă, bazată pe acuratețea determinării poziției picurilor; informații cantitative asupra concentrațiilor relative sau mărimea fiecărui pic şi o indicarea a performanței coloanei (Figura II.1).

În timpul trecerii lor prin coloana cromatografică, moleculele probei , petrec o parte din timp în faza mobilă şi o parte în faza staționară. Toate moleculele petrec acelaşi interval de timp în faza mobilă, acest timp fiind denumit ca timpul mort al coloanei şi este echivalent cu timpul necesar pentru ca un solut nereținut să ajungă la detector, de la momentul injectări.

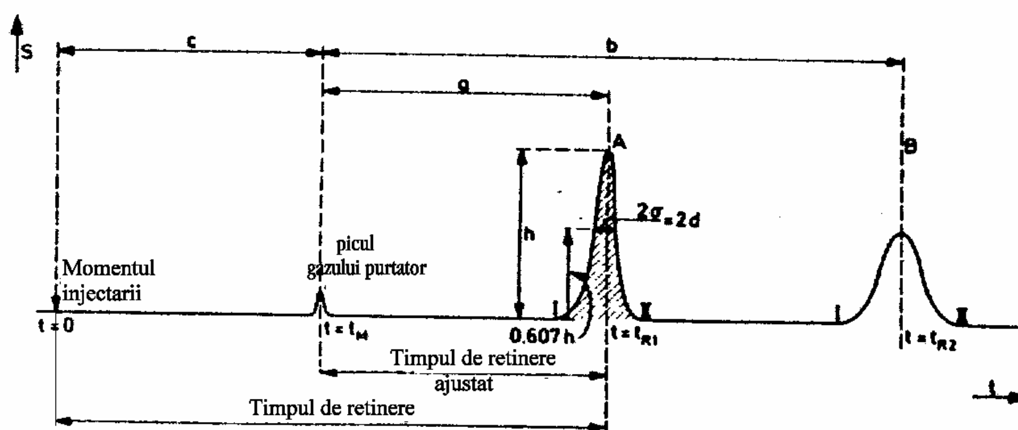


Figura I.1. Cromatogramă cu defința termenilor carcteristici

Timpul de reținere al unui solut (t_R) este intervalul de timp scurs de la momentul injectării probei în coloană şi momentul cînd detectorul sesizează maximul picului de reținere.

Timpii de reținere sau alți parametri derivați de la aceştia, sunt utilizați în analizele calitative (identificare) iar aria picurilor sau de regulă integrala (A) acestuia, fiind proporțională cu cantitatea componentului ajută la cunatificarea componeților din proba analizată:

$$A = \int_{t_1}^{t_2} S dt \qquad \text{(II.1)}$$

unde A este aria picului (în cm2); S este intensitatea semnalului dat de detector, t_1 şi t_2 sunt timpii între care începe şi se termină picul cromatografic considerat.

Timpul de reținere (t_R), reprezintă practic timpul necesar unui component dintr-o probă de a trece din faza staționară în faza mobilă (indicînd perioada pe care componentul chimic o petrece în coloan cromatografică). Acesta este dat de relația:

$$t_R = \frac{L}{u}(1+k) = t_M(1+k) \qquad \text{(II.2)}$$

unde L este lungimea coloanei (în cm); $\bar{u}$ este viteza liniară medie a fazei mobile (în cm/sec); k este un derivat al coeficientului de distribuție a componentului între cele două faze ($k = K\frac{V_L}{V_M}$, cu V_L volumul fazei staționare în coloană (în cm^3)şi V_M volumul fazei mobile în coloană (în cm^3)); $\frac{L}{\bar{u}} = t_M$ reprezintă timpul mort sau timpul la care apare picul gazului purtător; (t_R-t_M) reprezintă timpul de reținere ajustat.

Se poate concluziona că substanțele cu valori diferite pentru K vor avea timpi de reținere diferiți.

Fiecare component din probă după ce este separat de coloană, generează un semnal caracterizat nu numai de momentul apariției picului, ci şi de lărgimea acestuia (picurile A şi B din figura II.1). O descriere cantitativă a acestui feneomen este dată de numărul de talere ,N, ale coloanei, Numărul de talere teoretice se poate calcula cu relația:

$$N = \frac{t_R^2}{\sigma^2} \qquad \text{II.2}$$

unde N reprezintă numărul de talere şi σ^2 varianța picului eluat. Pentru picurile cu simetrie Gaussiană, deviația standard, σ, poate fi calculată din cromatogramă cu următoarea relație:

$$\sigma = \frac{2 \cdot d}{2} = d \qquad \text{(II.3)}$$

unde d este jumătatea lățimii picului la 0,607 din înălțimea picului considerat (Figura II.1).

Numărul talerelor (N) poate fi raportat la lungimea coloanei de separare (L), prin introducerea parametrului cantitativ H:

$$H = \frac{L}{N} \qquad \text{(II.4)}$$

unde H reprezintă echivalentul înălţimii unui taler teoretic. Acest parametru este o funcţie de viteza liniară medie a gazului purtător şi de un număr de parametri experimentali.

Gradul de separare (rezoluţia) a doi componenţi realizată de o colonă poate fi exprimată cu relaţia:

$$R_s = \left(\frac{\alpha - 1}{4\alpha}\right)\left(\frac{k}{k + 1}\right)\sqrt{N} \qquad \text{(II.5)}$$

unde α este factorul de separare

$$\alpha = t_{R'}(B)/t_{R'}(A) = k_B / k_A \qquad \text{(II.6)}$$

Separarea este în general completă dacă R_s =1,5 şi acceptabilă dacă R_s =1. În mod obişnuit coloanele pachet operează cu valori mari ale lui k şi de aceea raportul k/(k+1) este aproximativ unitar. În orice caz coloanele tubulare deschise operează cu valori mai mici ale lui k, deoarece raportul V_M/V_L este mai mare. Din acest motiv, pentru obţinerea rezoluţiei cerute este necesar un număr mai mare de talere teoretice pentru coloanele capilare.Un număr mare de talere teoretice se obţine uşor într-o coloană tubulară deschisă dacă lungimea acesteia este mărită.

II.3. Componentele cromatografului de gaze

În general sistemul cromatografic este compus din şapte componente majore (Figura II.1): butelia de gaz purtător(1); sistemul de control al debitului de gaz (2); sistemul de introducere a probelor (3); termostatul coloanei (4); coloana (5); detectorul (6); înregistratorul sau sistemul de procesare a datelor (7).

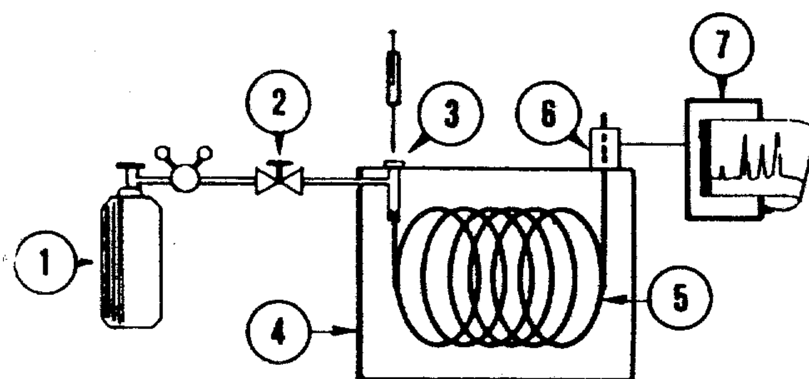


Figura II.1. Schema unui sistem GC

Gazul inert sau faza mobilă (N_2) trece continuu cu un debit constant de la butelia (1) direct în sistemul de introducere a probei, prin coloană şi ajunge apoi la detector. Viteza de curgere a gazului purtător este foarte bine controlată cu ajutorul unui "flow controler" (2), pentru a asigura o reproductibilitate a timpilor de reţinere şi pentru a minimaliza zgomotul detectorului. Probele sunt injectate (folosind de regulă o microseringă), în sistemul de introducere a probelor (3), caracterizat de o temperatură înaltă, ceea ce permite vaporizarea probelor şi trecerea lor în interiorul coloanei prin intermediul gazului purtător. În cazul compuşilor cu o stabilitate termică critică probele pot fi introduse direct în coloană ("on-column injection").

Coloanele pachet sunt alcătuite din tuburi de sticlă sau oţel în interiorul cărora se găsesc particole solide (suportul solid). Acest suport solid este îmbrăcat într-un film subţire şi uniform al unui lichid caracterizat de un punct de fierbere foarte ridicat (faza staţionară).

Coloanele capilare sunt practic nişte tuburi de sticlă sau silice fuzibilă, în interiorul cărora este localizată faza staţionară, sub forma unui film subţire care aderă pe pereţi.

După ieşirea din coloană gazul purtător şi proba ajung direct la detector. Rolul acestuia este de a sesiza prezenţa componenţilor unei probe şi de a genera un semnal electric proporţional cu cantitatea de component care ajunge la el. Detectorul va trimite semnalul rezultat la un înregistrator sau sistem de achiziţie a

datelor pentru ca în final să se obțină o cromatogramă. În noile instrumente GC sistemul de date afişează pe lîngă cromatogramă şi timpii de reținere şi rezultatele integrării picurilor cromatografice sub forma unui raport final de analiză.

II.3.1. Gazul purtator

Rolul gazului purtător este de a transporta proba de la injector, prin coloană pînă la detector. Gazul purtător trebuie să fie inert (să nu reacționeze cu nici unul din componeții probei sau cu faza mobilă). Alegerea gazului purtător poate afecta atît separarea cît şi viteza analizei. Un al doilea rol foarte important al gazului purtător este acela de a furniza o matrice corespunzătoare pentru detector la măsurarea componenților din probă. În cazul unui detector termic conductiv (TDC), gazele uşoare cu o conductivitate termică mare sunt corespuzătoare pentru obținerea unei sensibiltăți crescute şi uniforme. În acest caz He şi H_2 sunt cele mai utilizate gaze purtătoare. În cazul termistorilor utilizarea H_2 ridică unele probleme deoarece este posibil ca acesta să reacționeze cu oxizii pămînturilor rare din care sunt confecționați detectorii. Detectorii flam ionizatori (FID) operează cel mai adesea cu He sau H_2. În acest caz N_2 dă o sensibilitate de două ori mai mare decît în cazul utilizării H_2, la FID. În unele cazuri H_2 este utilizat drept gaz purtător la colanele capilare pentru efectuarea unei analize foarte rapide. Detectorii cu captură de electroni (ECD) utilizează de N_2 foarte uscat sau a amaestec de argon şi metan 5%.

O altă condiție pe care trebuie să o îndeplinească gazul purtător, este ca acesta să fie foarte pur. Această condiție este necesar a fi îndeplinită deoarece impuritățile pot genera o serie de degradări ale fazei lichide. Coloanele din poliesteri, poliglicoli sau poliamide sunt predispuse la astfel de degradări prin reacțiile acestora cu O_2 sau apa. De asemenea urmele de apă pot desorbi unii contaminanți din coloană provocînd un zgomot de fond ridicat (background) sau chiar aşa numitele picuri “fantomă”. Urmele de hidrocarburi din gazul purtător pot

cauza creşterea zgomotului detectorului de tip FID şi conduc totodată la diminuarea limitelor de detecţie.

Înlăturarea urmelor de apă şi de hidrocarburi se poate realiza prin instalarea unor filtre de tip site moleculare, între butelia gazului purtător şi cromatograf. Aceste site moleculare pot fi apoi regenerate prin încălzira lor la o temperatură de 300^0C timp de cca 3 ore, în curent de slab de N_2.

Acurateţea controlului debitului de gaz purtător este deosebit de importantă atît pentru mărirea eficienţei coloanei cît şi pentru analizele calitative şi cantitative. Pentru o analiză calitativă este esenţial să existe o reproductibilitate a vitezelor de curgere care se reflectă în acurateţea reproductibilităţii timpilor de reţinere. Comparînd timpii de reţinere sau alţi parametri dervaţi ai unor compuşi necunoscuţi, cu cei ai unor standarde se pot identifica rapid şi comod compuşii respectivi, dar trebuie precizat că este posibil ca unul sau doi compuşi să aibă acelaşi timp de reţinere. Identificarea componenţilor doar pe baza identităţii picului nu este elocventă cromatografiei de gaze, chiar şi cînd aceste instrumente sunt prevăzute cu detectori selectivi. În general această metodă necesită analize auxiliare cum ar fi: MS, RMN sau IR.

Datorită proprietăţilor fizice şi a concentraţiilor diferite ale componenţilor dintr-o probă, precum şi a diferitelor condiţii cromatografice (lungimea şi diametrul coloanei, procentul de masă a fazei staţionare, viteza fazei mobile) s-au dezvoltat mai multe tehnici de sampling, care sunt utilizate frecvent în analiza cromatografică de gaze. Mărimea probei analizate depinde foarte mult de tipul de coloană care este utilizată în analiză. Aceasta poate varia de la unităţi de grame pînă la unităţi de nanograme (Tabelul II.2).

Tabelul II.2
Intervalul volumelor de probă pentru diferite tipuri de coloane.

Tipul de coloană	**Diametrul mm**	**Faza lichidă**	**Probă gazoasă**	**Probă lichidă**
Capilară	0,25-0,5	0,5 μm	<10 μL	0,001-1 μL
Cu eficienţă mare	2	3%	0,1-1,0 mL	0,01-1 μL
Obişnuită	4,6	10%	0,1-10 mL	0,1-10 μL
Preparativă	20	20%	0,1- 1 L	0,01-1.0 mL

De asemenea starea de agregare impune şi tipul de sistem de introducere a probei în coloana cromatografică.

Probele gazoase se introduc de regulă utilizînd un sistem de de supape (Figura II.3).

În poziția de încărcare , curentul de probă gazosă, trece continuu printr-o buclă, pînă cînd în interiorul acesteia va fi numai proba. Volumul buclei cu probă este controlat prin lungimea şi diametrul tubului. În poziția de introducere a probei în colonă, sistemul de supape este rotit şi gazul purtător transferă proba din buclă direct în coloană. Sistemul de supape are o reproductibilitate bună , este uşor de manipulat şi poate fi mult mai uşor automatizat decît sistemul de introducerea probelor prin injectare.

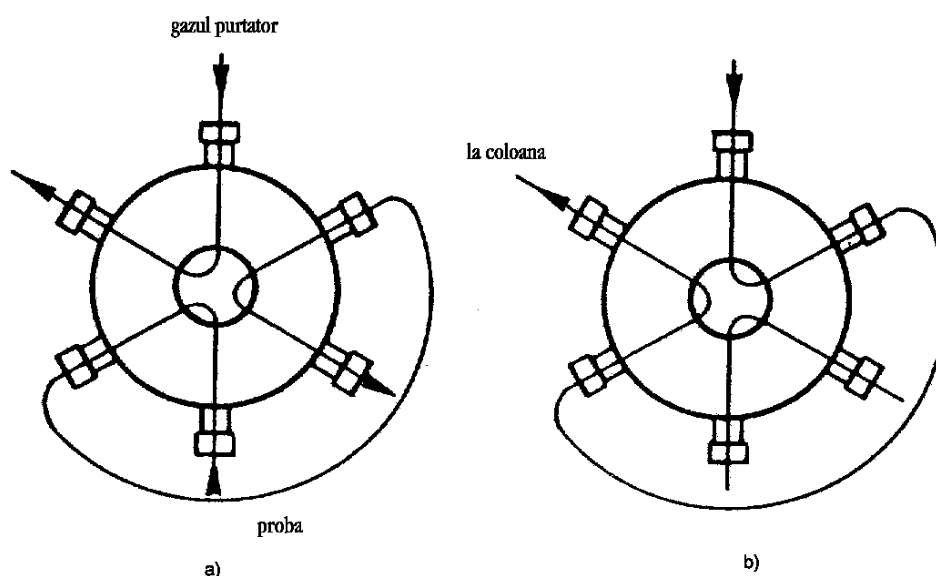


Figura II.3. Schema unui sistem de supape folosit pentru probe gazoase
a) poziția de înărcare cu probă; b) poziția de introducere în coloană

II.3.2. Sistemul de introducere a probelor

Majoritatea probelor analizate prin GC sunt în fază lichidă, fie că proba însăşi este lichidă fie că este rezultatul solubilizării unei probe solide. Acestea sunt vaporizate într-un sistem special înainte de a fi introduse în coloană. De cele mai multe ori pentru introducerea lor se folosesc seringi de la 1 la 10µL (în funcţie de mărimea coloanei şi a probei).

Se cunosc mai multe tipuri de sisteme de trecere a probelor lichide în stare de vapori (Figura II.4).

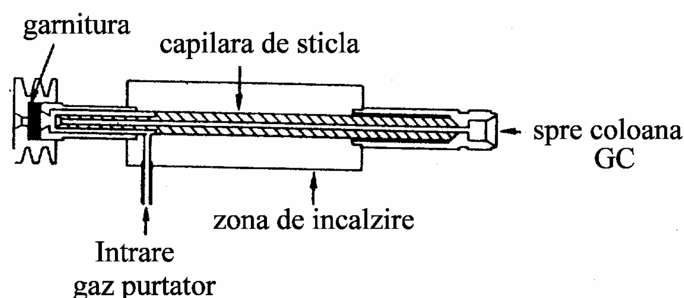


Figura II.4. Schema bloc a unui injector

La introducerea probei în injector, datorită temperaturii ridicate şi constante, aceasta se vaporizează trecînd direct sub acţinunea curentul gazului purtător în coloană. Volumul suplimentar este minimalizat pentru a asigura vaporizarea probei în coloană şi pentru a reducerea dispersia. Acest tip de injector este foarte des utilizat mai ales în cazul compuşilor sau probelor instabil termic (amino acizi, steroizi, pesticide, hidrocarbonate şi chiar unele medicamente).

În cromatografia de gaze se disting două categorii de coloane.

Prima categorie cuprinde aşa numitele coloane capilare sau coloane tubulare deschise, care sunt de fapt nişte tuburi deschise, caraterizate o permeabilitate crescută. În particular aceste tuburi sunt confecţionate din silice fuzibilă. În mod obişnuit se întîlesc două tipuri de asfel de coloane capilare, coloane capilare deschise în care faza lichidă (staţionară) acoperă pereţii interiori ai capilarei sub

forma unui film subțire; coloane capilare în care faza lichidă se află depusă pe un suport poros.

Cea de a doua categorie, coloanele pachet, sunt coloanele care conțin pachete de particole solide mai mult sau mai puțin dense. Coloanele pachet clasice sunt acele coloane care au în interior diametre de cca 1mm sau chiar mai mici. Coloanele care au o densitate substanțial mai scăzută decît cele calasice au fost denumite “pachet de coloane capilare”. Creşterea eficienței coloanelor pachet se poate realiza prin două modalități. Pe deoparte creşterea eficienței poate fi realizată prin micşorarea particulelor de pe suportul solid şi o a doua modalitate este prin creşterea lungimii coloanelor care conțin particole de dimensiuni mai mari. În ambele situați, este necesară o micşorare a presiunii în momentul utilizării acestor coloane.

Înălțimea talerului teoretic pentru o colană capilară este dată de relația:

$$H = \left[\frac{2D_m}{u_0} + \frac{11k^2 + 6k + r^2 u_0}{24(1+k)^2 D_m} \right] f_1 + \frac{2}{3} \frac{k d_f^2 u_0 f_2}{(1+k)^2 D_s} \qquad \text{(II.7)}$$

unde D_m este coeficientul de difuzie al componentului în faza mobilă; D_s este coeficientul de difuzie al componentului în faza staționară; r este diametrul interior al capilarei; d_f este grosimea filmului subțire al fazei lichide; k este factortul de capaciate al solutului; f_1 şi f_2 sunt factorii de corecție pentru presiune:

$$f_1 = \frac{9}{8} \frac{(P^4 - 1)(P^2 - 1)}{(P^3 - 1)^2}$$
$$f_2 = \frac{2}{3} \frac{(P^2 - 1)}{(P^3 - 1)} \qquad \text{(II.8)}$$

unde P reprezintă raportul presiunilor gazului purtător la intrarea şi la ieşirea din coloană (Pi/Pe), şi u_o este viteza liniară a gazului purtător la intrare în capilară sau:

$$u_0 = \frac{\bar{u}}{f_2} = \frac{L}{t_M f_2} \qquad \text{(II.9)}$$

În multe condițiile experimetale întîlnite în cromatografia de gaze, debitul de gaz poate fi considerat liniar. Debitul de gaz este proporțional cu gradientul de presiune:

$$u(x) = \frac{-k}{\eta}\frac{dp}{dx} \qquad \text{(II.10)}$$

în relația II? k este o măsură a permeabilitățti coloanei şi η caracterizează viscozitatea dinamică a gazului purtător[1]. Se poate spune că un gaz purtător este ideal pentru toate condițiile practice numai atunci cînd viscozitatea acestuia este independentă de presiune.

Integrînd acestă ecuație se obține:

$$u_0 = \frac{k}{2\eta L P_e}\left(P_e^2 - P_i^2\right) \qquad \text{(II.11)}$$

Valoarea obținută ajută la calcularea vitezei medii a gazului purtător prin coloană (realția II.9). Pentru coloanele capilare cu diametrul d_c, permeabilitatea este dată de relația:

$$k = d_c^2 / 32 \, .$$

Cu ajutorul relație II.7 se pot determina valorile optime pentru înălțimea unui taler (H) şi pentru viteza de curgere (u_o) a gazului purtător. În cele mai multe cazuri grosimea filmului fazei lichide este foarte mică, astfel că termneul al treilea din relația II.7, care reprezintă rezistența la transferul de masă a fazei lichide, se poate neglija. Astfel:

$$H_{\min} = \frac{1}{2} d_c f(k)$$

$$u_{0,optim} = \frac{1}{d_c}\frac{8D_m}{f(k)} \qquad \text{II.12}$$

$$f(k) = \sqrt{\frac{\left(1 + 6k + 11k^2\right)}{3(1+k)^2}}$$

aceste relații, rezultate în urma diferențialei ecuației II.7, dau condițiile optime pentru înălțimea unui taler teoretic şi viteza gazului purtător, în cromatografia de gaze.

În urma considerațiilor făcute, se pot trage urătoare concluzii:

a) - numărul maxim de talere teroretice, care poate fi obținut pentru o coloană capilară este independet de tipul gazului utilizat. Deasemenea, scăderea diametrului coloanei are ca rezultato creştere a numărului de talere pe unitate de lungime.

b) - viteza optimă pentru gazul purtător este în strînsă dependentă cu diametrul coloanei (d_c), cu factorul de presiune (f_2) şi cu natura acestuia (D_m). Dacă factorul f_2 este egal cu unitatea, viteza optimă pentru gazul purtător este direct proporțională cu coeficentul de difuzie (D_m), şi invers proporțională cu dimetrul cintern al capilarei. Gazele inerte, precum H_2 şi He au arătat interval destul de mari pentru valoarea optimă u_{opt}, hidrogenul putînd da o nalaiză mult mai rapidă (Figura II.5).

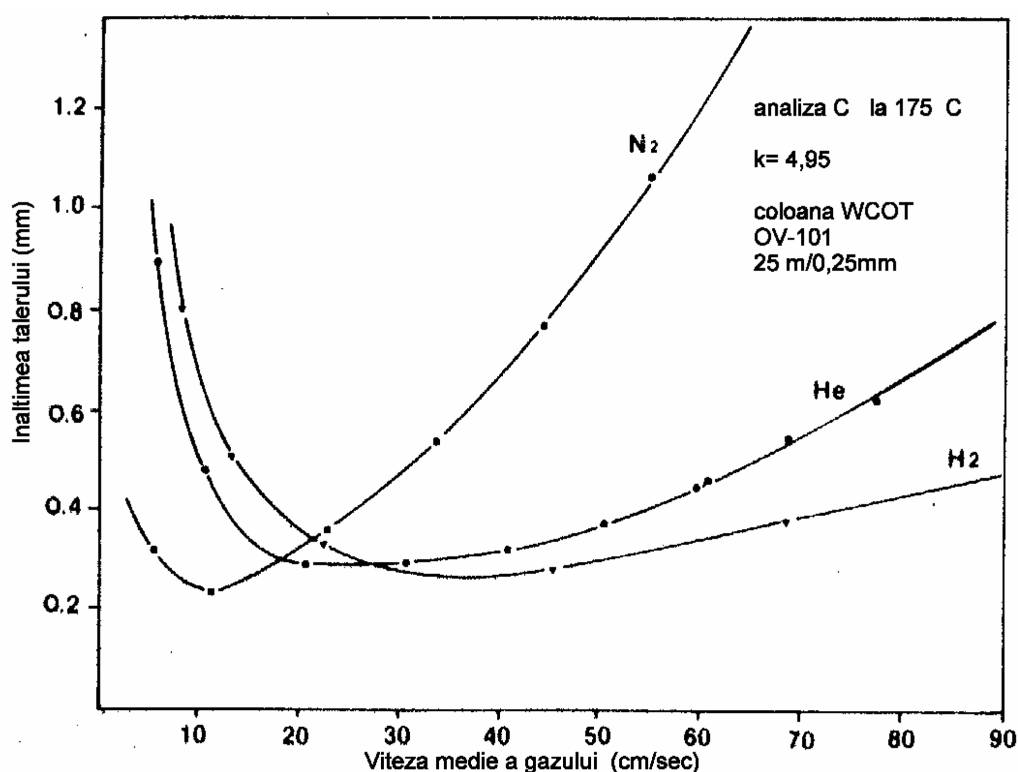


Figura II.5. Dependența H=f(u_{opt}) pentru , N_2, H_2, He

Considerînd în continuare, apoximația lui f_2 şi negiljarea termenului care dă rezstența la transferul de masă a fazei staționare, timpul de reținere pentru o

separarea unui component dintr-o probă nesită un anumit număr de talere teoretice (N) , şi se poate calcula cu relația.

$$t_R = t_M (1+k) = \frac{NH_{\min}}{u_{optim}}(1+k) \quad \text{(II.13)}$$

de aici se poate vedea ca tR este proporțional cu 1/dc, astfel că o reducere 1în diametru coloanei de cinci ori , va duce la o creştere a timpului analizei printr-un factor de 25.

Pentru optimizarea separărilor cromatografice, raportul timpilor petrecuți de solut în fază mobilă şi în faza staționară este foarte important[2]. Timpul în care solutul se află in faza staționră este in strînsă legătură cu afinitatea acestuia față de cele două faze:

$$k = \frac{t_{R'}}{t_M} = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} \quad \text{(II.14)}$$

Reținerea relativă pentru două picuri adiacente într-o cromatogramă poate fi descris de factorul de separare (α), dat de relația:

Factorul de separare este o măsură a selctivității unui sistem cromatografic. De multe ori acest factor mai este numit şi factor de selectivitate sau selectivitate.

II.3.3. Temperatura coloanei

Coloana cromatografică este termic controlată pentru ca separările care sunt făcute, să poate fi reproductibile. Deasemenea este important pentru o coloană să potă fi operabilă într-un interval larg de temperaturi, de la –180 peste 400^0C. Controlul temperaturii coloanelor este este important şi usor de realizat deaorece acest parametru de multe ori influențează separarea.

Temperatura coloanei trebuie să fie suficient de rridicată pentru a asigurao analiză completă şi intr-un timp rezonabil. Pe de altă parte temperaturile prea ridicate pot conduce la o diminuare a factorului de separare şi a factorului de capacitate a componeților din probă ceea ce de cele mai multe ori duce la o

rezoluție foarte mică. În acord cu o simplă aproximație, timpul de rețienre se dublează pentru fiecare scădere cu 30^{0}C a temperaturii coloanei. În multe cazuri, pentru separea componenților unei probe temperaturile joase sunt preferate (Figura II.6).

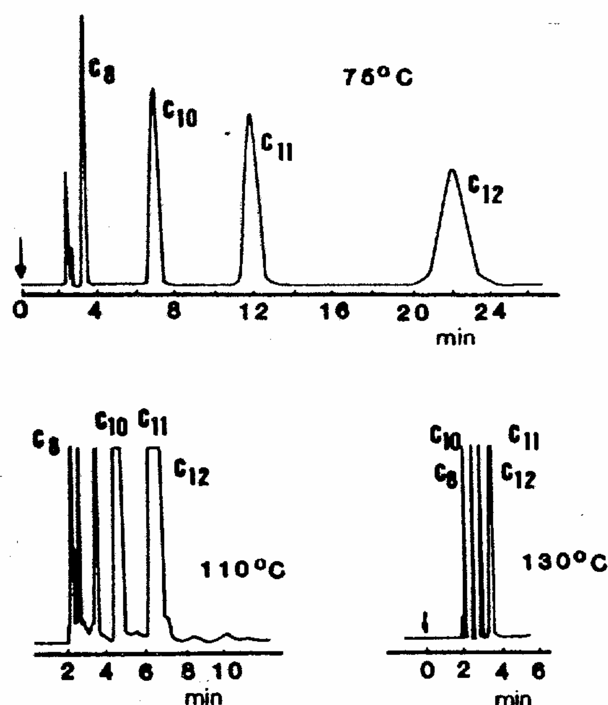


Figura II.6. Efectul temperaturii în analiza unui amestec de hidrocarburi simple

În funcție de acest important parametru, metodele cromatografice sunt clasate în două categori, analiză izotermă cînd temperatura coloanei este menținută constantă pe tot parcursul analizei şi analiză cu proggram de tempertură , cînd , pe parcursul efectuării analizei, temperatura coloanei creşte în timp, deobicei cu o viteză liniară (5-40^{0}C/min). În figura II.7 este prezentată diferențele care apar în cazul celor două metode de analiză. De obicei analiza cu program de temperatură este des utilizată în analiză amestecurilor ce conțin componeți cu temperaturile de fierbere foarte diferite.

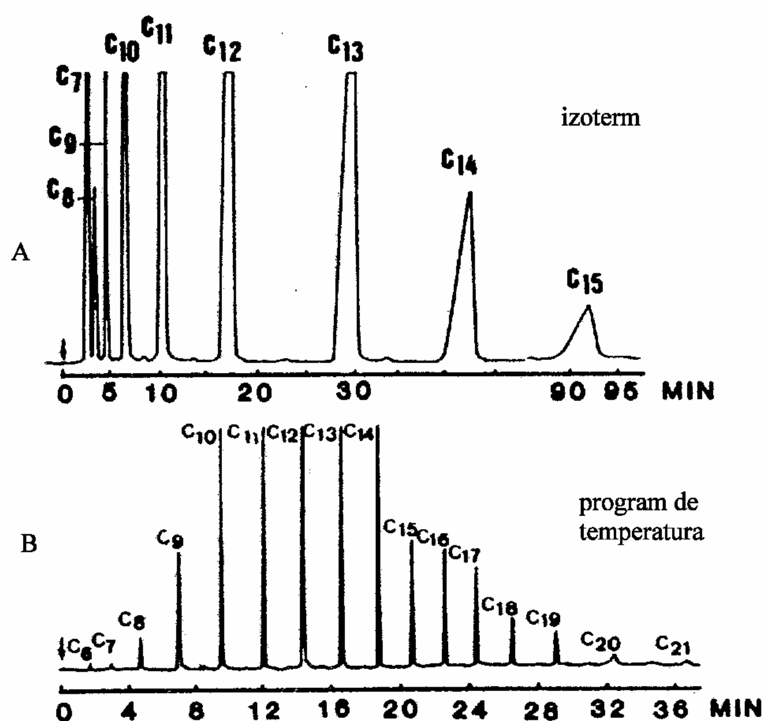


Figura II.7. Comparație între cromatogramele izotermă şi cu program de temperatură

În analiza cu program de temperatură, temperatura inițială este scăzută, asfel că primul pic cromatografic va fi datorat compusului cel mai volatil, urmînd ca următoarele picuri să fie pentru compuşii cu volatilitate din ce în ce mai mică. În general intervalul în care operea ză analiza cromatografică este cuprins între 60 – 280^{O}C.

II.3.4. Detectori utilizați în cromatografia de gaze

Detectorul cromatografic generează un semnal electric proporțional cu cantitatea componentului care părăseşte coloana. Detectorii pot fi clasificați în două clase.

a) – detectori dependenți de concentrație;

b) - detectori dependenți de viteza masică.

În detectorii dependenți de concentrație, (TCD şi ECD), semnaluldetectorului este proporțional cu concentrația probei din gazul purtător. În detectorii dependenție de viteza masică (FID), semnalul detectorului este dependent de masa probei care trece prin detector pe unitate de timp.

Sensibilitate unui detector este definită ca fiind mărimea semnalului produs pentru o concentrație dată a unei probe sau pentru o anumită viteză masică. Un detector sensibil va genera un semnal intens pentru mărimea probei date. Acestă sensibiltate poate fi determinată din panta dreptei, în care se reprezintă dependența răspunsulului detectorului funcție de concentrația sau viteza masică a probei.

Zgomotul detectorului generat de răspunsul acestuia într-un interval de timp scurt sau la întîmplare, este dependent de proprietățile electrice ale detectorului, temperatura de lucru şi debitul gazului purtător. Zgomotul este un factor care determină cantitatea minimă de probă care poate fi detectată. Cantitatea de probă care generează un semanal de două ori mai intens decît nivelul zzgomotului, este definită ca fiind cantitatea minim detectabilă.

Foarte des utilizați ca detectori în cromatografia de gaze sunt detectorul termic conductiv (TCD), flam-ionizator(FID), detector captură de electroni (ECD).

Detectorul termic-conductiv (TCD).

Principiul de funcționare care stă la baza acestui detector este că un corp încăzit va pierde căldură cu o anumită viteză deteminată de compoziția gazului înconjurător. Deci viteza pierderii căldurii poate fi utilizată ca o măsură a compoziției gazului. Figura II.8 prezintă schema unui detector termic conductiv, constituit dintr-un filament din tungsten, localizat în interiorul unei cavități. Cavitatea este protejată de o manta din oțel inoxidabil, care menține temperatura la o valoare constantă.

Filamentul încălzit poate pierde căldură prin schimbul termic cu părțile mai reci ale blocului din oțel prin următoarele procese:

a) conducție termică;

b) convecție;

c) radiație;

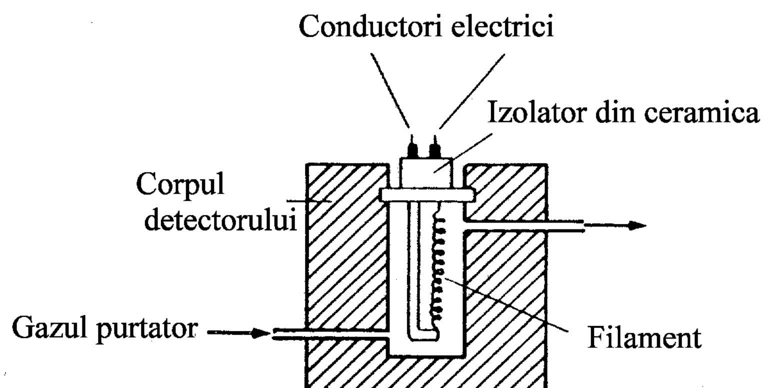


Figura II.8. Celulă cu conductibilitate termică

Procesele majore sunt pierderea căldurii prin conducție termică gazoasă şi convecție forțată. Aceste două procese produc o pierdere de 75% a căldurii filamentului. Unele gaze purtătoare precum He sau H_2 pot cauza o răcire a filamentului mai mult pe baza conducției termice.

Căldura este trannsferată instantaneu prin conducție cînd moleculelegazului purtător ating filamentul încălzit. Cu cît vitezele de curgere sunt mai mari cu atît viteza de pierdere a căldurii este mai mare. Din acest motiv TCD este sensibil la debitul de gaz. Diferențele între conductivitățile termice ale gazelor sunt bazate pe mobilitatea sau viteza cu care moleculele gazului difuzează (moleculele mai mici au o mobilitate mai mare şi o conductivitate termică ridicată). De aceea H2 şi He, care sunt cele mai mici molecule au o cea mai mare conductivitate termică.

Detectorul flam-ionizator (FID)

Detectorii ionizatori operează pe baza principiului că conductivitatea electrică a gazului este direct proporțională cu concentrația particuleor încărcate din gazul purtător.

În FID o flacără de H_2 este folosită pentru ionizarea probelor. Gazul purtător de la coloană trece direct în flacăra care ionizează o parte din moleculele organice. Prezența particoloelor încărcate (ioni pozitivi şi ioni negativi şi electroni) în pațiul liber al electrodului (Figura II.9) generază un curent care este măsurat de un rezistor. Voltajul rezultat este amplificat de un electrometru şi trimis apoi la un un înregistrator.

Se poate considera că spațiul liber al electrodului este un rezistor variabil a cărui rezistență are o valoare dată de numărul de particole încărcate din acesta spațiu. Cînd un compus organic ajunge în flacără el este supus combustiei ş particulele încărcate sunt formate. Acesta va determina descreşterea rezistenței spațiului liber şi creşterea curentului.

Răspunsul înregistratorului este proporțional cu cantitatea de compus organic eluat din coloană. Figura II.9 prezintă schema unui detector asfel de FID.

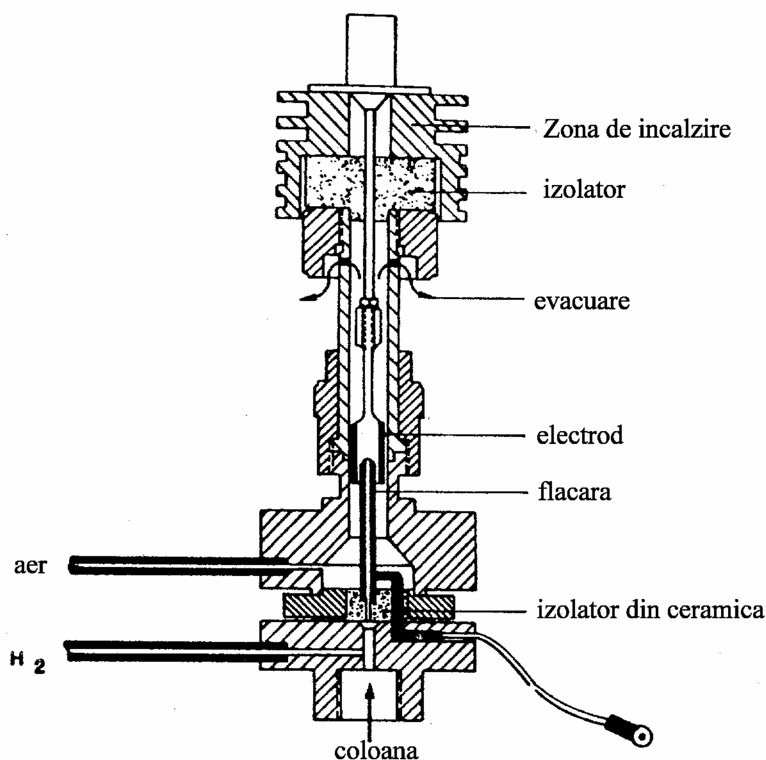


Figura II.9. Detectorul flam-ionizator

Trebuie menţionat faptul că detectorii tip FID răspund numai la compuşii organici.

Aceşti detectori sunt corespunzători pentru analiza compuşilor organici aflaţi în urme, în aer sau apă.

Detectorul cu captură de electroni(ECD)

Acest tip de detector se bazeză pe măsurarea scăderii semnalului electric. În funcţie de modul de realizare a curgerii gazului putrtător spre detector, o plăcuţă de ^{63}Ni radioactivă ionizează gazul şi procesul de formare a electronilor este lent (Figura II.10). Aceşti electroni migrează la anod care în mod normal are un potenţial de cca 90V . Colectare acestor ioni conduce la un curent de cca 10^{-8} A, care este amplificat de un electrometru.

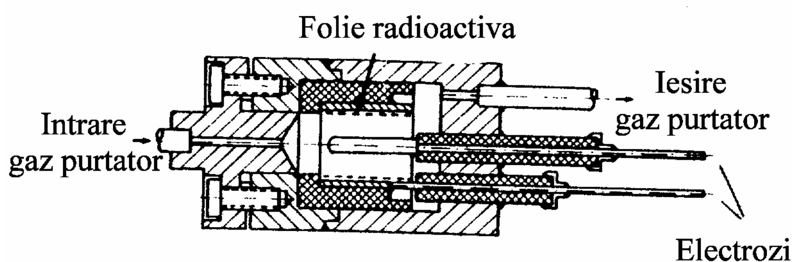


Figura II.10. Detector captură de electroni

Existenţă unui component cu afinitate pentru electroni va produce o scădere a acestui curent staţionar. Această pierdere de curent este afiştă ca un pic pozitiv.

Cele mai moderne detectoare de acest tip, au posibilitatea menţinerii curentului la o valoare constantă pe baza unor pulsuri voltaice cu frecvenţă variabilă. Frecvenţa pulsurilor este proporţinală cu concentraţia probei şi poate fi utilizată pemtru analize cantitative.

Acest detector este foarte sensibili la derivați polihalogenațai ai alcanilor, la carbonili conjugați, nitriți, nitrați, compuşi polinitroaromatici şi specii organometalice. Este insensibil la hidrocarburi alcooli şi cetone.

III. TANDEMUL CROMATOGRAFIE - SPECTROMETRIE DE MASA

III.1 Introducere

III.2. Spectrometria de masă

III.2.1. Generalități

III.2.2. Aspecte tehnice si aparatura

III.2.2.1. Sistemul de introducere a probelor

III. 2.2.2. Surse de ionizare utilizate în sistemul GC-MS

III.2.2.3. Tipuri de analizoare utilizate în sistemul GC/MS

III.2.2.4. Detectorii de ioni.

IIII.2.2.5. Tipuri de interfețe pentru sistemul GC/MS

IIII.2.2.6. Puterea de rezolutie a spectrometrelor de masa

III.3 Monitorizarea datelor in spectrometria de masa

III. TANDEMUL CROMATOGRAFIE - SPECTROMETRIE DE MASA

III.1 Introducere

Cromatogramele dau informații cu privire la complexitatea (numărul de componenți), cantitatea (înălțimea picului sau aria acestuia) şi identitatea (parametrul de reținere) componenților dintr-un amestec. Identificarea compuşilor chimici prin luarea în considerare numai a parametrului de reținere este de cele mai multe ori nerelevantă, chiar şi în cazul analizei unor amestecuri mai simple. Cînd se poate stabili cu mare precizie identitatea unui component din probă, atunci informațiile cantitative provenite de la cromatogramă sunt considerate a fi foarte bune. Situația este inversă la tehnicile spectrometrice deoarece acestea furnizează suficiente informații calitative din care se poate deduce identitate substanței, cu un grad mai mare de certitudine. Cu toate acestea instrumentele spectrometrice au două limitări practice.Adeseori în spectrometrie este destul de dificil să se obțină toate informațiile cantitative din semnalele generate şi pentru o reală identificare cu aceste tipuri de instrumente este necesar să se folosească probe cu un înalt grad de puritate. Astfel tehnicile cromatografice şi spectrometrice furnizează informații complementare despre identitatea şi concentrația componeților dintr-o probă.

Descoperirea unor spectrometre de masă capabile să asigure o eficiență şi rezoluție ridicată în determinarea structurii compuşilor chimici din probe complexe, a condus la extinderea utilizării lor ca detectori în tehnica combinată GC-MS.

Detectorii conveționali de tip flamionizatori, sau detectori cu captură de electroni sunt înlocuiți în prezent de detectori de masă selectivi sau detectori tip „ion trap“, care au avantajul că asigură un grad de specificitate deosebit de înalt, şi în cele mai multe cazuri cu o sensibilitate ridicată.

Principala tehnică combinată de analiză şi cel mai des utilizată, este cromatografia de gaze interpusă spectrometriei de masă (GC/MS) şi spectrometriei în infraroşu cu transformată Fourier (GC/FTIR).

Avantajele prezentate de tehnicile în tandem, de tipul GC-MS, duc la utilizarea acestora pe scară largă în vederea analizei produşilor chimici (de natură organică, în special, sau anorganică) din mediul înconjurător.

Alte tipuri de tehnici cuplate utilizate în analizele compuşilor chimici, dar cu o arie mai mică de aplicabilitate, sunt: cromatografia de lichide-spectrometria de masă (LC/MS), cromatografia de lichide-spectrometria în infraroşu cu transformată Fourier (LC/FTIR) şi cromatografia de lichide-rezonanța magnetică nucleară; cromatografia în strat subțire-spectrometria de masă (TLC/FTIR), cromatografia în strat subțire-spectrometria în infraroşu cu transformată Fourier (TLC/FTIR). În ultimul timp au fost puse la punct şi tehnici în serie care permit realizarea cuplării mai multor tipuri de instrumente analitice(GC/FTIR/MS).

Toate aceste tehnici sunt caracterizate prin abundența de date pe care le pot furniza. Avantajul major al acestor metode de analiză constă în faptul că permit folosirea calculatoarelor sau microprocesoarelor de mare putere, în vederea controlului proceselor care au loc în fiecare instrument analitic, achiziția, stocarea, vizualizarea şi interpretarea datelor. Calculatoarele oferă de asemenea posibilitatea obținerii directe a spectrelor de masă şi astfel interpretarea datelor spectrale devine mai puțin dificilă.

Tandemul GC-MS furnizează o serie de avantaje complementare celor prezentate de cromatografia de gaze. Interfața sistemului GC-MS, realizată de cele mai multe ori prin sisteme deosebit de complexe, are capacitatea de a asigura menținerea probei în condiții optime pentru analiză, evitînd descompunerea sau degradarea termică şi permite totodată obținerea unor timpi de reținere reproductibili de la o analiză la alta.

III.2. Spectrometria de masa

III.2.1. Generalitati

Spectrometria de masă este una din cele mai utilizate metode de analiză pentru stabilirea structurii compuşilor organici. La baza acestei metode au stat observatiile lui Wien (1898) privind posibilitatea devierii unui flux de ioni pozitivi de către un cîmp magnetic sau electric. Desi primele spectre de masa au fost trasate in 1912 de catre J.J. Thomson, aplicarea larga a spectrometriei de masa a inceput in jurul anului 1940 cand Hoover abordeaza analiza cantitativa a amestecurilor de hidrocarburi. Dupa 1948, o serie de cercetatori ca Beynon, McLafferty, William si altii, in urma unor studii sistematice, stabilesc reguli generale si specifice de fragmentare care permit stabilirea structurii compusilor organici. Dificultatile majore in raspandirea larga a spectrometriei de masa a constituit-o si o constituie inca pretul mare si intretinerea dificila a aparaturii.

Spectrul de masă este obţinut prin transformarea probelor într-un amestec gazos de ioni şi separarea acestora funcţie de raportul *m/z*. Spectrometria de masă este considerată a fi cea mai aplicată tehnică analitică în cercetarea ştiinţifică, deoarece este capabilă să dea informaţii despre calitatea şi cantitatea compuşilor organici şi anorganici din amestecuri complexe, despre structura unui număr mare de specii moleculare complexe, despre raportul izotopilor atomilor dintr-o probă şi despre structura şi compoziţia suprafeţelor solide.

În tabelul III.1 este prezentată evoluţia acestei tehnici analitice de-a lungul anilor. De precizat că toate din aplicaţiile prezentate în acest tabel se întîlnesc încă în laboratoarele moderne.

Tabelul III.1.
Evoluţia spectrometriei de masă.

Eveniment	Dată aproximativă	Aplicaţii
-Descrierea comportării ionilor în cîmp magnetic	1920	-Determinarea abundenţelor izotopilor unui element
-Dubla focalizare	1935	-Obţinerea unei rezolţii mai înalte

-Comercializarea primului spectrometru de masă	1950	-Analize cantitative ale produselor petroliere
-Sursa tip scînteie	1955	-Analize cantitative elementale
-Stabilirea regulior de fragmentare a speciilor moleculare	1960	-Identificare şi analize structurale ale moleculelor complexe
-Cuplarea spectrometrului de masă cu cromatograful de gaze	1965	-Analize calitative şi cantitative ale amestecurilor complexe
-Spectrometre de masa în tandem	1970	-Analiza rapidă a amestecurilor complexe
-Noi tehnici de ionizare	1970	-Creşterea capacității de elucidare a structurii compuşilor
-Aplicarea transformatei Fourier la spectrometria de masă	1980	-Îmbunătățirea rezoluției si a raportului semnal-zgomot.
-Îmbunătățirea surselor pentru compuşii nevolatili	1980	-Analiza polimerilor şi a suprafețelor

Un termen carcteristic în spectrometria de masă este raportul masă-sarcină (*m/z*) a ionilor atomici sau moleculari. Acest termen se obține prin divizarea directă a masei ionului rezultat, la numărul sarcinilor ionului dat. Deoarece majoritatea ionilor obținuți în spectrometria de masă au o singură sarcină, termenul *m/z* este adeseori prescurtat la termenul *masă.* Această abreviere nu este tocmai corectă în termeni stricți, dar este des întîlnită în literatura de specialitate.

In principiu spectrometria de masa consta in:

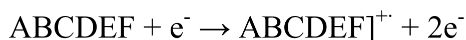
a. obtinerea ionilor pozitivi (ionizarea probei);

b. separarea acestor ioni in functie de raportul dintre masa si sarcina lor (m/e) (in general $e_{maxim} = 3$);

c. inregistrarea abundentelor relative ale ionilor.

Diversitatea mare a ionilor care se formeaza este cauzata de transformarile pe care la pot suferi moleculele organice in spectrometrul de masa. Acestea pot fi redate in modul cel mai general prin urmatoarea schema:

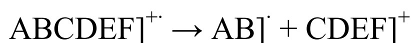
1. *Ionizarea*:

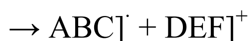

$ABCDEF + e^{-} \rightarrow ABCDEF]^{+\cdot} + 2e^{-}$

Ion molecular

2. *Fragmentarea*:

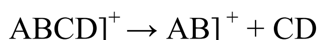
a. fragmentarea ionului molecular:


$ABCDEF]^{+\cdot} \rightarrow AB]^{\cdot} + CDEF]^{+}$

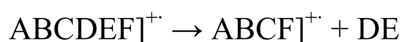

$\rightarrow ABC]^{\cdot} + DEF]^{+}$

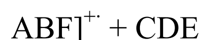

$\rightarrow ABCD]^{\cdot} + EF]^{+}$

b. scindarea in continuare a fragmentelor ionice:


$ABCD]^{+} \rightarrow AB]^{+} + CD$

c. fragmentari insotite de transpozitii:


$ABCDEF]^{+\cdot} \rightarrow ABCF]^{+\cdot} + DE$


$ABF]^{+\cdot} + CDE$

Ionii radicali formati pot suferi in continuare fragmentari conform schemei a.;

d. coliziuni ioni-molecule neutre:


$ABCDEF]^{+\cdot} + ABCDEF \rightarrow ABCDEFABCDEF]^{+\cdot} \rightarrow ABCDEFA]^{+} + BCDEF]^{\cdot}$

Probabilitatea formarii ionilor de coliziune este mica si in general previzibila;

e. formarea ionilor cu sarcina multipla:


$ABCDEF + e^{-} \rightarrow ABCDEF]^{n+} + (n+1)\, e^{-}, \quad n \leq 3$

Probabilitatea aparitiei acestor ioni este foarte mica si specifica anumitor clase de compusi;

f. formarea ionilor negativi


$ABCDEF + e^{-} \rightarrow ABCDEF]^{-\cdot} \rightarrow ABCD]^{-} + DEF]^{\cdot}$

Acesti ioni se formeaza numai in anumite conditii.

S-au notat cu A, B, C, D, E si F diferiti atomi sau grupari de atomi din molecula, iar cu $]^{+\cdot}$, $]^{+}$, $]^{\cdot}$ ionii-radicali, ionii pozitivi si radicalii la care nu se poate preciza pe care atom sau grupare de atomi se gaseste sarcina sau caracterul de radical. Cand se cunoaste exact pozitia sarcinii, aceasta se noteaza simplu, in dreptul atomului care o poarta.

III.2.2. Aspecte tehnice si aparatura

Indiferent de principiile care stau la baza construcţiei lor, orice spectrometru de masă trebuie să permită obţinerea, separarea în funcţie de *m/z* şi înregistrarea ionilor pozitivi (uneori şi negativi) provenţi din fragmentările compuşilor organici. Cum în marea majoritate a cazurilor $z=e=1$, separarea şi înregistrarea ionilor se face în funcţie de masele lor. În figura III.1 este prezentată schema bloc a unui spectrometru de masă.

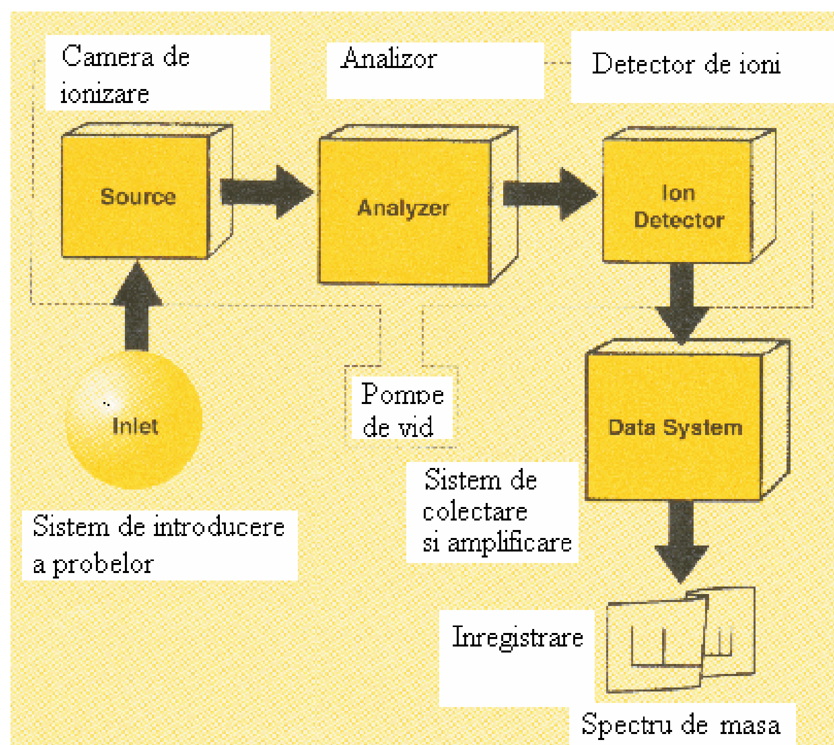


Figura III.1. Principalele componente ale unui spectrometru de masă

Scopul sistemului de introducere a probelor este de a introduce cantităti mici de probă (de ordinul micromolilor sau mai mici) în spectrometrul de masă, unde componenţii sunt convertiţi într-un amestec gazos de ioni. Adesea, aceste sisteme conţin dispozitive speciale de volatilizare a probelor solide şi lichide.

Sursa de ionizare a spectrometrului de masă converteşte componenţii probelor în ioni, prin bombardarea cu ioni, electroni, atomi sau fotoni. O

alternativă la acest tip de ionizare este obținerea directă a ionilor probei, prin ionizare termică sau electrică. În unele cazuri sursa de ioni şi sistemul de introducere a probei se găsesc cuplate într-un singur component.

În ambele situații, la ieşire, proba se găseşte sub forma unui curent de ioni pozitivi sau negativi (cel mai adesea pozitivi), care apoi este decelat în analizorul de masă. Rolul analizorului de masă este analog cu rolul rețelelor de difracție din spectrometrele optice, în fapt, dispersia realizîndu-se în acest caz pe baza raportului *m/z* a ionilor probei. Ca şi spectrometrele optice, spectrometrele de masă cuprind un detector (pentru ioni) care converteşte radiația ionică într-un semnal electric, care este procesat, stocat în memoria unui calculator şi afişat sau înregistrat în diferite variante.

O caracteristică importantă a spectrometrelor de masă, care nu este găsită în cazul spectrometrelor optice (doar în cazul spectrometrelor electronice), este existența unui sistem de vidare, care menține o presiune joasă (între 10^{-4} şi 10^{-8} torri), în toate componentele aparatului, mai puțin în sistemul de procesare şi redare a semnalului.

III.2.2.1. Sistemul de introducere a probelor

In functie de volatilitatea si stabilitatea termica a probei, precum si de tipul sursei de ionizare, aparatul este prevazut cu diverse sisteme de introducere.

Cantitatea de proba necesara pentru trasarea spectrului variaza intre 10^{-6} si 2mg in functie de tipul si caracteristicele aparatului, sistemul de introducere a probelor, masa moleculara, tipul sursei de ionizare.

Prin cuplarea cromatografiei de gaz cu spectrometria de masa, gazele si lichidele pot fi introduse in aparat fara a mai fi izolate.

III. 2.2.2. Surse de ionizare utilizate în sistemul GC-MS

Spectrele de masă date de speciile moleculare sunt în strînsă legătură cu metoda folosită pentru producerea gazului ionic. Inițial formarea gazului ionic se baza pe bombardarea componenților gazoşi cu un fascicol de ioni. În ciuda cîtorva dezavantaje ale acestei metode ea este încă de o importanța majoră, mai ales că toate spectrele de masă care se găsesc în literatura de specialitate au fost realizate prin această tehnică. În ultimii ani, au fost realizate mai multe tipuri noi de surse, care oferă cîteva avantaje față de sursa clasică, (fascicul de electroni). În tabelul III.2 sunt prezentate cîteva din sursele noi folosite în spectrometria de masă. În mod curent, spectrometrele de masă sunt echipate cu accesorii care permit utilizarea mai multor tipuri de surse.

Tabelul III.2.
Surse de ionizare utilzate în spectrometria de masă

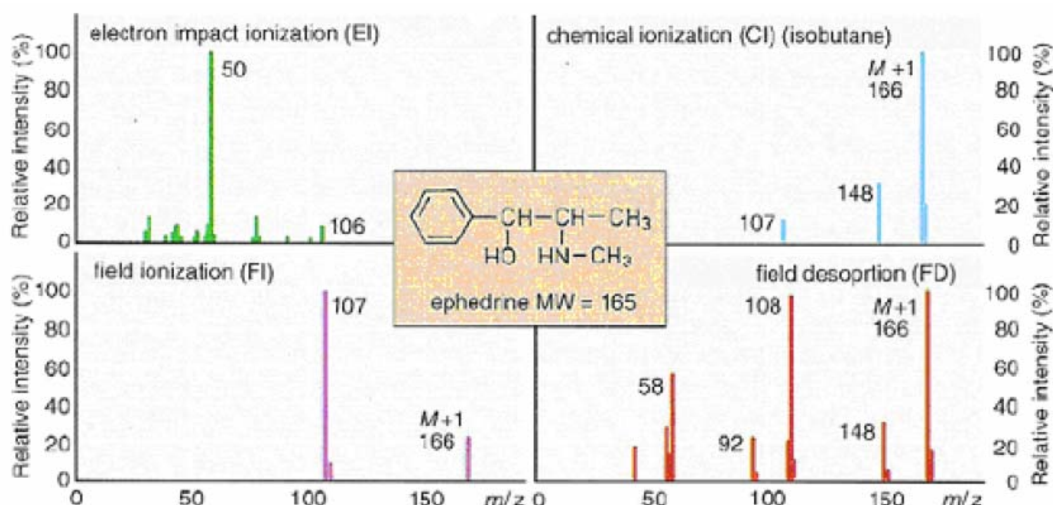
Numele sursei	Abrevierea	Tipul de sursă	Agentul de ionizare
Ionizare cu fascicol de electroni	EI	fază gazoasă	electroni energici
Ionizare chimică	CI	fază gazosă	ionii reactivului
Cîmp de ionizare	FI	fază gazoasă	electrozi cu potențial înalt
Cîmp de desorbție	FD	desorbție	electrozi cu potențial înal
Bombardare cu atomi rapizi	FAB	desorbție	atomi energici
Desorbție laser	LD	desorbție	raza laser
Desorbție în plasmă	PD	desorbție	energia înaltă de fisiune a ^{252}Cf
Desorbție termică	EHMS	desorbție	temperatura
Ionizarea electrohidrodinamică	ES	desorbție	cîmp electric înalt
Ionizare tip termospray	ESI		difuzia de sarcini pozitive în picăturile de soluție a probei

Functie de tipul sursei, ionizarea moleculelor organice se poate realiza pe mai multe căi. Cele mai importante tehnici de ionizare, care pot fi utilizate în tandem cu separarea cromatografică, includ:

- ionizarea electronică (EI);
- ionizarea chimică (CI);
- ionizarea prin pulverizare in cimp electrostatic (ESI);
- tehnici de desorbtie:
    - ionizarea prin bombardarea cu atomi rapizi (FAB);
    - ionizare prin desorbtie laser (LD);
    - ionizare prin desorbtie laser in prezenta unei matrici (MALDI);

- ionizare prin desorbtie in cimp electrostatic (FD);
- ionizare prin desorbtie in plasma (PD).

Efectul diferitelor tehnici de ionizare asupra fragmentarii moleculelor organice este diferit dar complementar (ceea ce sugereaza utilizarea a cel putin doua tehnici de ionizare pentru aceiasi molecula), asa cum se poate observa din figura de mai jos:



Compararea spectrelor de masa ale aceluiasi compus prin utilizarea a patru surse de ionizare diferite: EI, CI, FI, FD.

Ionizarea electronica (Electron impact ionization, EI)

Metoda de ionizare prin impact cu un fascicol energetic de electroni a fost mult timp singura utilizata in spectrometria de masa si inca se foloseste cu succes, mai ales in cazul compusilor nepolari, cu mase moleculare relativ mici (pana la 1000), volatili si stabili termic.

Sursele cu impact electronic (Figura III.2), se bazează pe încălzirea unui filament (Wolfram sau Reniu) aflat într-o cameră vidată, care generează un fascicol de electroni cu energii foarte apropiate.

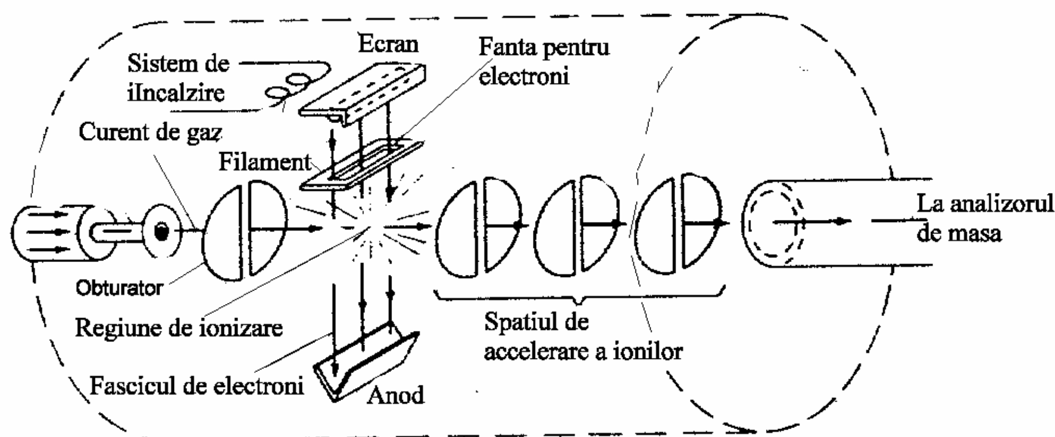
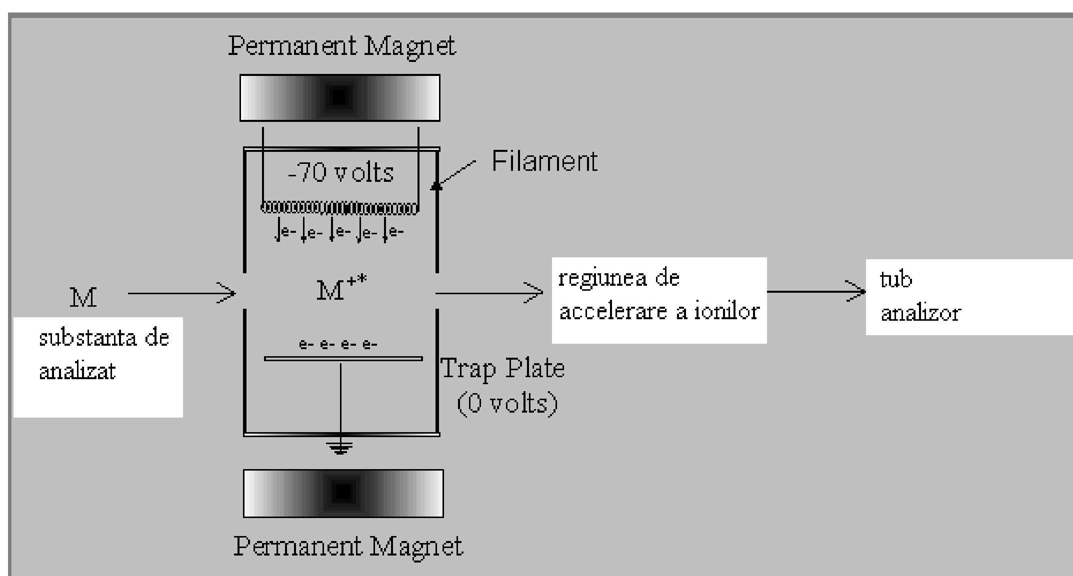


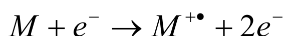
Figura III.2. Schema de principiu a unei camere cu ionizare cu impact de electroni

Electronii odata generati sunt apoi accelerati spre anod, urmind traiectorii elicoidale (datorita miscarii in cimpul magnetic generat de un magnet permanent):



Moleculele de gaz intalnite in incinta de ionizare interactioneaza cu fascicolul de electroni, cu formare de ioni ce pot fi separati si detectati pe baza raportului m/z. Energia fascicolului de electroni poate fi reglata intre 5-100 eV. Energia electronilor este controlată prin intermediul unui potențial de accelerare stabilit între catod şi sursă. Daca energia fascicolului de electroni este de 5-15 eV, din molecula este smuls un electron, luand nastere ionul molecular $M^{+\cdot}$. Potențialul la

care apare ionul $M^{+\bullet}$(eventual alți ioni dacă $M^{+\bullet}$ este instabil) se numeşte *potențial de apariție* si este diferit in functie de structura compusului organic.



$$M + e^{-} \rightarrow M^{+\bullet} + 2e^{-}$$

Electronii rămaşi se distribuie cît mai uniform posibil pentru ocuparea orbitalei rămasă vacantă, slăbind în acelaşi timp diferite legături ale ionului molecular. Pentru realizarea spectrului de masă, proba este bombardată cu un fascicol de electroni cu energia de 70 eV. În aceste condiții, timpul de viață al ionului molecular variază între 10^{-14}-10^{-4} secunde, el scindîndu-se foarte repede la nivelul celor mai slabe legături, dînd naştere la un număr mare de fragmentări. Cu cat energia fascicolului de electroni este mai mare, cu atat numarul fragmentelor este mai mare, astfel incat pentru reproductibilitatea spectrelor este necesar sa se mentina aceeasi intensitate a fascicolului de electroni. Modurile de fragmentare sunt adesea dictate de structura ionului molecular ($M^{+\bullet}$).

Deoarece mulți compuşi organici au potențialele de ionizare de la 7 la 20 eV, energia transferată în urma coliziunii dintre electroni şi moleculele neutre este suficientă să determine atît ionizarea cît şi fragmentarea multiplă. Majoritatea ionilor formați prin acest proces au o singură sarcină, dar pot apare şi fragmente moleculare cu sarcini multiple şi chiar ioni cu sarcini negative. În cele mai multe cazuri ionii negativi reprezintă doar o fracțiune foarte mică din numărul total de ioni formați. Temperatura din aria de ionizare asigură menținerea în stare de vapori a probei, la o presiune de cca 10^{-5} torri. La această presiune drumul mediu liber al ionilor este suficient de mare, pentru ca numărul de coliziuni dintre ionii moleculari şi molecule să fie cît mai redus la ieşirea acestora din sursă. Ionii pozitivi sunt scoşi din aria de ionizare prin respingere electrostatică, electrodul avînd un potențial pozitiv mic, care îi direcționează direct spre fanta de intrare în analizor. Fascicolul de ioni rezultat, focalizat, colimat şi accelerat sub forma unui fascicol de ioni cu energii egale (sau foarte apropiate), este trimis spre analizorul spectrometrului.

În spectrometrele moderne sursa de ionizare şi analizorul operează la presiuni diferite. În aceste instrumente presiunea sursei de ionizare este mai mare

decît cea a analizorului, pentru care cea mai optimă valoare a presiuni este de cca 10^{-7} torri.

Avantajele EI:

- tehnica de lucru foarte bine bine pusa la punct si cunoscuta;
- exista deja baze de date privind fragmentarea compusilor organici;
- se poate cupla cu GC;
- se preteaza si pentru compusii insolubili sau nepolari.

Dezavantajele EI:

- necesita compusi volatili si termic stabili;
- uneori nu furnizeaza ionul molecular;
- nu se poate cupla cu LC;
- se preteaza compusilor cu mase moleculare mici (<1000).

Bombardarea moleculelor neutre cu un fascicol de electroni cu energii înalte, conduce la formarea de ioni-radicali moleculari cu exces de energie. Ionul molecular furnizează informații utile despre identitatea moleculei definită prin masa moleculară. Din păcate, în condițiile ionizării electronice aceşti ioni pot fi în unele situații instabili pentru a putea genera un spectru, chiar şi atunci cînd sunt utilizate fascicole cu energii joase (15-20 eV). În aceste condiții este necesară utilizarea unei alte metode de ionizare, mai puțin energică, cum ar fi ionizarea chimică, în vederea obținerii informațiilor privind masa moleculară.

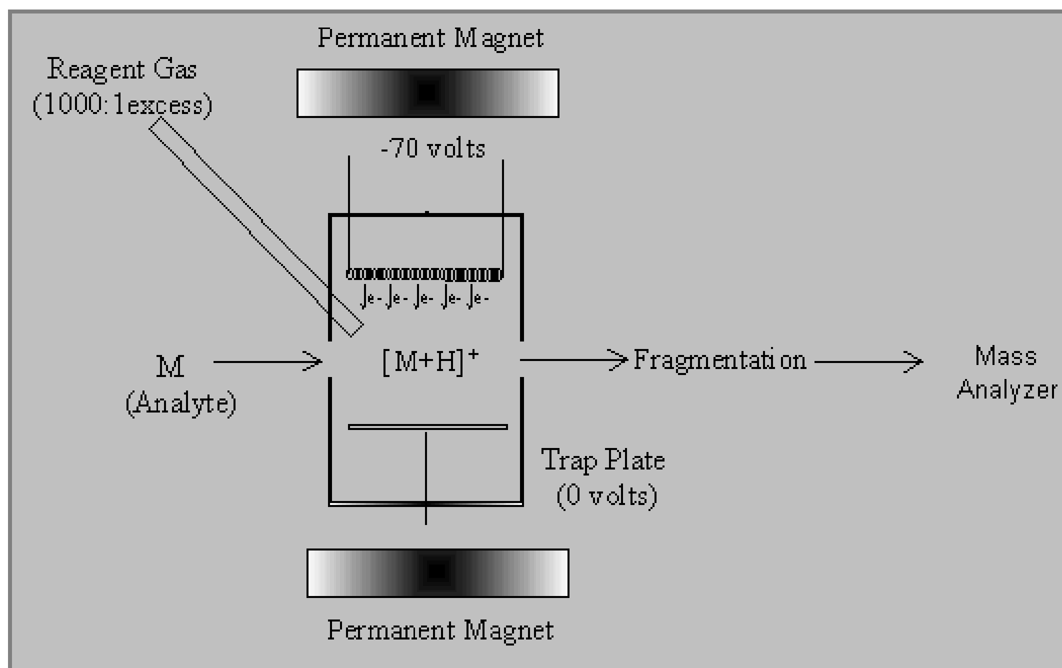
Ionizarea chimica (Chemical Ionization, CI)

Ionizarea chimică este probabil cea de-a doua procedură foarte des întîlnită, pentru producerea ionilor în spectrometria de masă.

Principiul metodei consta in utilizarea unui gaz reactant (CH_4, NH_3, NO, izobutan, etc), care este ionizat sub energia unui fascicol de electroni, iar ionii astfel formati, reactioneaza in continuare cu moleculele probei de analizat.

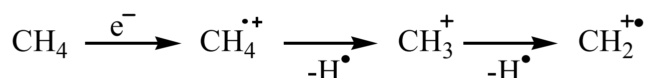
Pentru obținerea ionizării chimice, este nesesară modificarea ariei fluxului de electroni, arătată în figura III.2. Practic, în aria de ionizare trebuie să se obțină o presiune de cca 1 torr pentru gazul reactiv, în timp ce în analizor trebuie să se

mențină o presiune mult mai scazuta, de cca 10^{-5} torri şi totodată trebuie modificat şi diametrul fantei de intrare în analizor. Cu aceste modificări, gazul reactiv este introdus în interiorul regiunii de ionizare în aşa fel încît acesta să fie într-o concentrație de 10^3-10^4 mai mare decît concentrația probei.

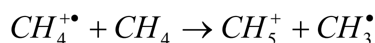


Deoarece concentrația gazului reactiv este aşa de mare, fascicolul de electroni va reacționa în exclusivitate cu moleculele gazului reactiv. În condițiile de presiune corespunzătoare sursei de ionizare chimică, este favorizată producerea electronilor termali, care pot fi captați de moleculele sau fragmentele ion moleculare, cu o afinitate mare pentru electroni, conducînd la apariția ionilor moleculari cu sarcină negativă. Numărul de ioni negativi în acest caz poate fi cu două sau chiar trei ordine de mărime mai mare decît în ionizarea cu impact de electroni (EI), facînd practic posibilă utilizarea spectrometriei de masă prin ionizare chimică negativă ca o tehnică analitică viabilă. Deoarece mulți compuşi care sunt predispuşi la formare de ioni negativi sunt biologic activi sau substanțe toxice, spectrometria de masă cu ionizarea chimică negativă este o tehnică foarte importantă în studiile biomedicale şi de mediu.

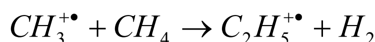
Unul din cei mai utilizați reactivi chimici de ionizare este metanul, care interacționează cu un fascicol de electroni cu energii mari (70eV), conducînd la o serie de ioni de tipul: $CH_4^{+\bullet}$, $CH_3^{+\bullet}$, $CH_2^{+\bullet}$, $C_2H_3^{+\bullet}$. Aceşti ioni, interaționeză mai departe cu moleculele neutre de metan conform schemei de mai jos:



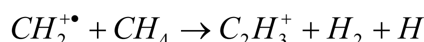
$$CH_4 \xrightarrow{e^-} CH_4^{\bullet +} \xrightarrow[-H^\bullet]{} CH_3^{+} \xrightarrow[-H^\bullet]{} CH_2^{+\bullet}$$



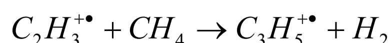
$$CH_4^{+\bullet} + CH_4 \rightarrow CH_5^{+} + CH_3^{\bullet}$$



$$CH_3^{+\bullet} + CH_4 \rightarrow C_2H_5^{+\bullet} + H_2$$

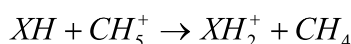


$$CH_2^{+\bullet} + CH_4 \rightarrow C_2H_3^{+} + H_2 + H$$



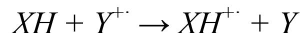
$$C_2H_3^{+\bullet} + CH_4 \rightarrow C_3H_5^{+\bullet} + H_2$$

Introducerea unor cantități mici de probă în interiorul sursei (CI), declanşează reacția dintre ionii gazului reactiv şi moleculele neutre ale probei. Cele mai importante reacții sunt: - transferul de proton de la ionul gazului la molecula neutră a probei, rezultînd astfel ionul molecular de tip XH_2^{+}:



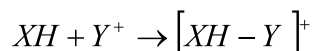
$$XH + CH_5^{+} \rightarrow XH_2^{+} + CH_4$$

- transfer de sarcina:



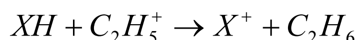
$$XH + Y^{+\cdot} \rightarrow XH^{+\cdot} + Y$$

- adiția electrofilă a ionilor gazului la moleculele neutre ale probei:



$$XH + Y^{+} \rightarrow \left[XH - Y\right]^{+}$$

- transferul anionului hidrură ($H^{-\bullet\bullet}$) de la molecula neutră a probei la ionul gazului reactiv:



$$XH + C_2H_5^{+} \rightarrow X^{+} + C_2H_6$$

Ionii probei rezultați prin acest tip de ionizare conduc la un număr mult mai mic de fragmentări decît în cazul EI. Astfel ionizarea chimică (CI) este mult mai utilizată pentru determinarea maselor moleculare decît EI.

Apariția şi reproductibilitatea spectrelor de masă obținute prin ionizare chimică depind de o serie de factori şi anume: condițiile de ionizare, temperatura

(în principal), presiunea şi puritatea gazului reactiv. În general spectrele obținute prin CI nu sunt la fel de reproductibile ca cele date de sursele EI.

Sursele de ionizare la presiunea atmosferică diferă de celelalte surse deoarece în acest caz ionizarea se realizează la presiune atmosferică, în condițiile în care se stabileşte un echilibru între ioni şi moleculele neutre.

Ionii reactivi sunt generați prin bombardarea unui gaz inert (N_2), cu electronii generați de o placuță de ^{63}Ni. Rezultatul este formarea unei plasme ce conține ioni şi electroni formați din ionizarea gazului purtător şi de la reacțiile ion-moleculelor urmelor de impurități ce pot exista în acest gaz (apă, O_2, moleculele de solvent intrate în sursă). Ionizarea moleculelor probei se realizează fie prin reacția directă cu electronii din plasmă fie prin reacția ion-moleculelor impurităților. În aceste condiții se pot forma, atît ioni negativi cît şi ioni pozitivi, prin adiția sau substituția anionului hidrură, prin schimbarea sarcinilor, prin captură de electroni şi prin formarea de aducți cu ioni tip „cluster".

Avantaje:

- furnizeaza ionul molecular;
- permit cuplare cu GC;
- se preteaza compusilor insolubili.

Dezavantaje:

- necesita compusi volatili si termic stabili;
- se preteaza compusilor cu mase moleculare mici (<1000);
- nu furnizeaza fragmentari ale probei.

Tehnicile de ionizare prezentate mai sus necesită mai întîi o vaporizare a probelor, excluzînd practic posibilitatea analizei compuşilor nevolatili şi cu instabiltate termică ridicată precum şi a probelor ionice. Pentru aceste tipuri de probe este indicată folosirea altor tehnici de ionizare şi anume: bombardarea cu atomi rapizi (FAB), termosprayul şi electrosprayul.

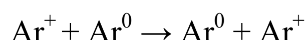
Ionizare prin bombardare cu un fascicol de atomi rapizi (Fast Atomic Bombardment, FAB)

În cazul bombardării cu atomi rapizi, proba este mai întîi dizolvată într-un solvent vîscos (matrice), şi apoi este bombardată cu un fascicol de particule cu viteză mare. Cel mai adesea aceste particule sunt atomi ai gazelor rare, argon (Ar) sau xenon (Xe), cu o energie cuprinsă între 2-10 KeV (Figura III.3).

Fascicolul de atomi neutri rapizi de gaz rar se obtine intr-un tun, prin schimb de sarcina intre un fascicol accelerat de ioni si gaz neionizat, ex.:



$Ar \rightarrow Ar^{+} + e^{-}$



$Ar^{+} + Ar^{0} \rightarrow Ar^{0} + Ar^{+}$

Ulterior s-a apelat la utilizarea unui fascicol primar de ioni de Cs^{+} in locul fascicolului neutru de gaz (se obtine prin evaporarea unei sari de Cs). Fascicolul primar (atomi de gaz rar, sau ioni Cs^{+}) cade pe suprafata probei sub un unghi de 60-70°, iar ionii produsi sunt apoi extrasi si focalizati in analizor.

Proba de analizat este dizolvata in matricea respectiva si se depune pe un suport metalic (cupru sau inox).

Rezultatul impactului este difuzia materialului în fază gazoasă printr-un moment de transfer, în care o parte din proba desorbită poate trece atît în ioni pozitivi dar şi în ioni negativi. Aceşti ioni sunt apoi extraşi din aria de ionizare şi direcționați spre analizorul spectrometrului.

Spectrul de masă este datorat formării unor ioni de tipul $[M+H]^{+}$ şi $[M-H]^{-}$ uneori fiind posibilă şi formarea şi unor ioni tip „cluster“, aceste specii rezultînd din implicarea ionilor pseudomoleculari combinați cu un număr variabil de molecule neionizate din matricea solventului sau cu moleculele neutre ale probei.

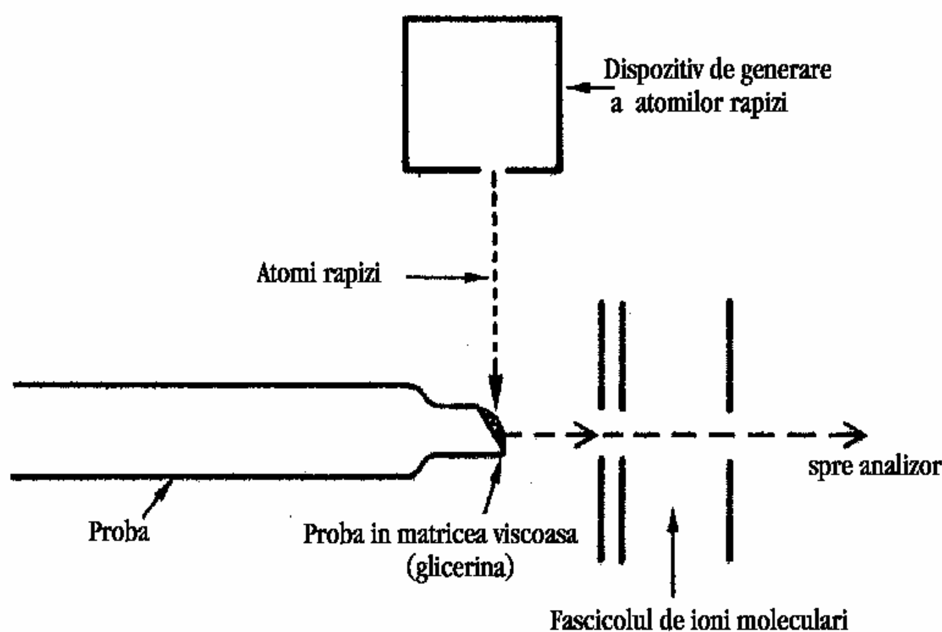


Figura III.3. Schema unei surse de ionizare cu atomi rapizi

În cele mai multe cazuri difuzia şi ionizarea produc un număr mic de fragmente ionice, dar suficiente pentru a obţine informaţii cu privire la structura şi la masa moleculară a probei.

Ca matrice se folosesc lichide cu vascozitate mare si volatilitate scazuta, cu o presiune de vapori mica si in care proba sa fie cat mai solubila: alcool meta-nitro benzilic (MNBA), glicerol, tioglicerol, dietanolamina, trietanolamina, etc.

Avantaje:

- furnizeaza ionul molecular;
- se preteaza compusilor labili termic;
- se preteaza la compusi cu mase moleculare mari (>10000).

Practic metoda permite analiza unor compusi ionici, compusi cu mase moleculare mari si polimeri. Metoda este convenabila si pentru compusii instabili termic sau cu volatilitate scazuta, compusii fiind investigati in solutie.

Dezavantaje:

- necesita compusi solubili in matrix;

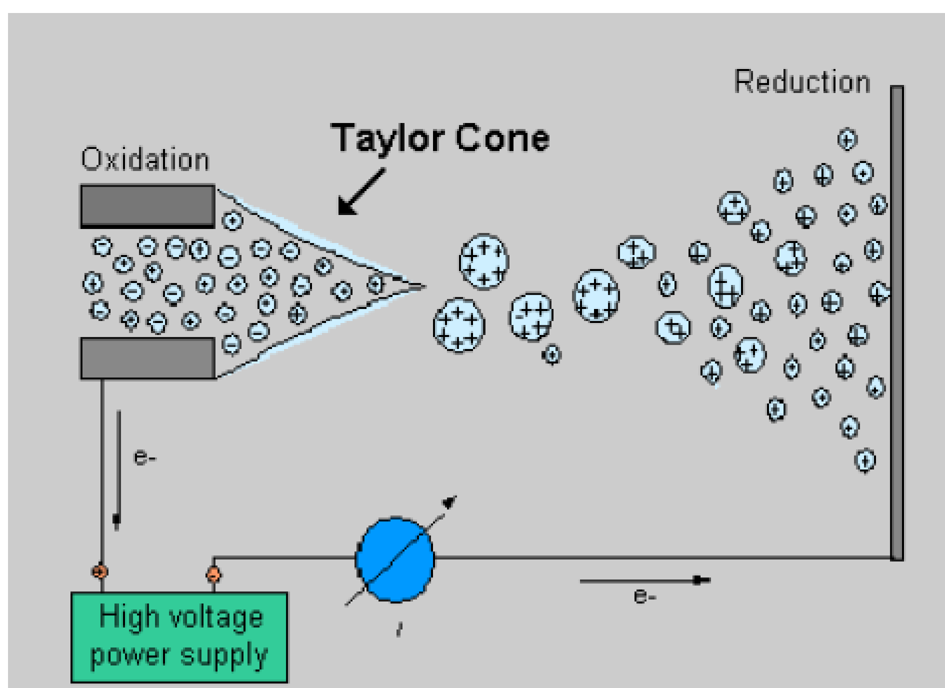
- sensibilitate scazuta;
- nu furnizeaza fragmentari ale probei;
- operare dificila.

Ionizarea prin pulverizare in camp electrostatic (Electrospray ionization, ESI)

Este o metoda recenta de ionizare, iar descoperirea acestei tehnici a condus la obtinerea premiului Nobel in chimie in 2002 de catre John Bennett Fenn.

Pentru acest tip de ionizare este necesar ca substanta de analizat sa fie dizolvata intr-un solvent polar si volatil, de exemplu MeOH, MeCN, etc. Desorbtia ionilor din solutie se realizeaza prin pulverizarea si formarea unor picaturi foarte fine sub actiunea unei surse de energie termica, aerodinamica, electrica, sau o combinatie a acestora. Gazul care inconjoara picaturile furnizeaza energia termica necesara evaporarii solventului. Metoda opereaza la presiune atmosferica si temperatura mediului ambient.

ESI presupune crearea unui camp electric prin aplicarea unei diferente de potential la nivelul capilarei prin care se pulverizeaza lichidul, cu ajutorul unor electrozi situati in imediata vecinatate. Fluxul de lichid va capata astfel o forma conica la iesirea din capilara (con Taylor), din care se vor desprinde apoi picaturile. Initial, la potential scazut, prin pulverizare se obtin picaturi de dimensiuni relativ mari, care nu permit desorbtia ionilor. Crescand potentialul aplicat capilarei, are loc o pulverizare continuu, sub forma unui grup de picaturi foarte fine de ioni pozitivi sau negativi, desprinse din conul de lichid format la capatul capilarei.



Avantaje:

- furnizeaza ionul molecular;
- poate fi cuplata cu HPLC;
- se preteaza compusilor labili termic;
- operare usoara;
- se preteaza la compusi cu mase moleculare mari (>100000).

Dezavantaje:

- necesita compusi polari solubili in solventi polari (MeOH, acetona, acetonitril);
- metoda este sensibila la saruri;
- nu furnizeaza fragmentari ale probei.

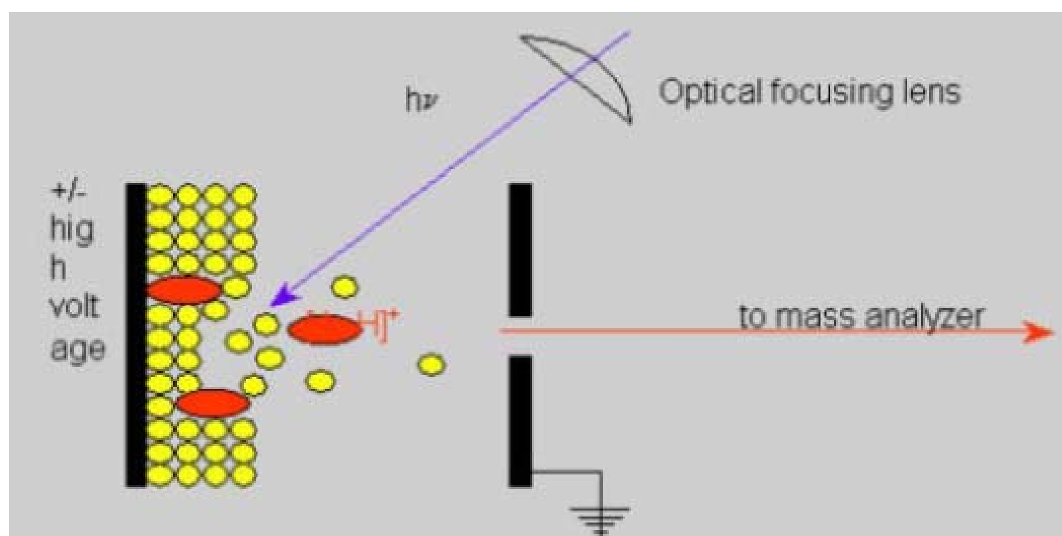
Ionizare prin desorbtie laser (LD)

Ionizare prin desorbtie laser in prezenta unei matrici (MALDI)

In aceasta metoda, atat desorbtia, cat si ionizarea au loc sub influenta unei radiatii laser, fie in absenta, fie in prezenta unei matrici. Se utilizeaza doar tehnica

in pulsuri, in astfel de procese fiind mai probabila detectia speciilor [M+ metal alcalin]$^{+}$ decat a speciilor $[M + H]^{+}$. Formarea de cationi are loc prin reactii in faza gazoasa intre ioni si molecule. Ionizarea si desorbtia au loc printr-o combinatie de procese de excitare in faza solida, a unor procese de excitare electronica individuala si a unor reactii fotochimice.

Cresterea puterii radiatiei laser are ca efect absorbtia ulterioara de energie de catre ioni, ceea ce poate conduce la un proces de fragmentare controlat.



In cazul analizei unor biomolecule cu mase moleculare foarte mari prin tehnica MALDI, substanta este inglobata intr-o matrice care trebuie sa absoarba puternic la lungimea de unda a laserului aplicat (acid nicotinic, p-nitroanilina, etc).

Avantaje:

- furnizeaza ionul molecular;
- se preteaza compusilor labili termic;
- se preteaza la compusi cu mase moleculare mari (>100000);
- operare usoara.

Dezavantaje:

- necesita o mare varietate de matrice;
- nu furnizeaza fragmentari ale probei.

Ionizare prin desorbtie in camp electrostatic (FD)

Metoda blanda de ionizare si desorbtie a ionilor formati pe suprafata unui anod metalic. Proba de analizat este depusa initial pe suprafata filamentului, ionizata sub aceasta forma, iar ionii formati de desorb ulterior. Formarea ionilor poate avea loc prin:

- interactiunea cu electronii sub influenta campului electric
- aditie de protoni sau cationi
- ionizare termica-necesita incalzirea filamentului

Ionizare prin desorbtie in plasma (PD)

Pricipial metoda consta in desorbtia ionilor din substanta de analizat depusa pe o folie de aluminiu sau poliester acoperit cu aluminiu, sub influenta fragmentelor de fisiune generate de o sursa ^{252}Cf plasata in spatele foliei respective. Particulele sub actiunea carora are loc ionizarea si desorbtia ionilor au energii foarte mari, aprox 100 MeV, fata de energiile de ordinul keV in cazul tehnicii FAB. Metoda se poate utiliza pt analiza unor compusi cu mase moleculare mai mari decat in cazul metodelor FAB.

Moleculele de proteine fixate pe nitroceluloza se desorb fara fragmentare sau cu un grad mai redus de fragmentare decat in absenta acesteea.

III.2.2.3. Tipuri de analizoare utilizate în sistemul GC/MS

Ionii rezultați în sursa de ionizare trebuie mai întîi separați în funcție de raportul *m/z* înainte ca aceştia să ajungă la detector. Această selecție este realizată cu ajutorul unui analizor de masă.

Se cunosc mai multe tipuri de analizoare de masă care sunt utilizate frecvent în tandemul GC/MS, dintre care cele mai importante sunt: analizorul magnetic cu o singură focalizare, analizorul cu dublă focalizare, analizor tip quadrupol şi analizor „ion trap“.In tabel sunt prezentate principalele tipuri de spectrometre de masa care difera ca principiu constructiv si functional intre ele.

Analizor	Pret	Gabarit	Rezolutie	Domeniu de analiza
Sectorial magnetic	+	+	++	++
Quadrupol	+++	+++	+	+
Triplu quadrupol	++	+++	+	++
Trapa de ioni	++	+++	+	++
TOF	++	++	++	+++
Q-TOF	+	++	++	+++
FTICR	-	+	+++	++

In ultimul timp s-au dezvoltat metode de analiza care folosesc doua sau mai multe spectrometre de diferite tipuri, inseriate intre ele, fie doua principii constructive diferite, incorporate in acelasi analizor si care opereaza consecutiv asupra ionilor formati, astfel incat performantele realizate sa fie cat mai bune.

Separarea ionilor funcție de raportul *m/z* se realizeză prin acțiunea unui cîmp electric şi/sau magnetic. Puterea de rezolvare a spectrometrelor este o măsură a abilității acestor analizoare să facă distincție între două fragmente ionice cu valorile raporturilor *m/z* foarte apropiate(rezoluția- relația III.1). Spectrometrele de masă utilizate în tandemul GC/MS, sunt de două tipuri : cu rezoluții medii (R: 500-2.000) şi cu rezoluții înalte (R: 10.000-75.000).

$$R = \frac{M}{\Delta M} \qquad \text{(III.1)}$$

unde ΔM este diferența între masele corespunzătore celor două picuri adiacente, şi M este masa nominală corespunzătoare primului pic.

Asupra ionilor pozitivi formați se exercită o forță proporțională cu sarcina lor şi cu diferența de potențial dintre electrozi. Conform acestei dependențe, putem scrie pentru un ion oarecare cu masa *m:*

$$F = e \cdot V = \frac{m \cdot v^2}{2} \qquad \text{(III.2)}$$

Din această relație putem observa că ionii diferiți care rezultă în urma fragmentărilor vor avea energii cinetice egale. Posibilitatea variației în limite largi a

potențialului dintre electrozi permite reglarea cu precizie ridicată a vitezelor de ieşire a ionilor din camera de ionizare.

Analizorul de masă cu o singură focalizare (Figura III.5), este aşezat între polii unui cîmp magnetic Cîmpul magnetic de intensitate H, este orientat perpendicular pe direcția de deplasare a ionilor şi acționează asupra acestor cu o forța magnetodinamică centripetă F_{cp}:

$$F_{cp} = H \cdot z \cdot v \quad \text{(III.3)}$$

deteminînd curbarea traiectorie acestora. Acestei forțe i se opune forța centrifugă F_{cf}:

$$F_{cf} = \frac{m \cdot v^2}{r} \quad \text{(III.4)}$$

unde r este raza de curbură a arcului de cerc descris de traiectoria particulei. Parametrii acestei traiectorii pot fi deduşi prin egalarea celor două forțe:

$$H \cdot z \cdot v = \frac{m \cdot v^2}{r} \quad \text{(III.5)} \qquad v = \frac{H \cdot z \cdot r}{m} \quad \text{(III.6)}$$

ținînd cont de relația III.2 se obține:

$$z \cdot V = \frac{H^2 \cdot z^2 \cdot r^2}{2m} \quad \text{(III.7)} \qquad r = \sqrt{\frac{2m \cdot V}{H^2 \cdot z}} \quad \text{(III.10)} \qquad \frac{m}{z} = \frac{H^2 \cdot r^2}{2V} \quad \text{(III.11)}$$

Din realția III.11 se poate oserva că pentru anumite valori ale lui H şi V, vor ajunge la fanta de ieşire numai ionii cu un anumit raport *m/z*.

Ionii cu *m/z* mai mari vor parcuge traiectorii cu raze mai mari, iar cei cu *m/z* mai mici vor parcurge traiectorii cu raze mai mici decît raza de curbură a aparatului, ciocnindu-se de pereții lui, ceea ce va determina descărcarea acestora. Prin varierea lui H sau a lui V se poate obține tot spectrul de masă. De obicei se variază potețialul de accelerare V, care este făcut să scadă continuu, ceea ce conduce la traversarea analizorului de către ioni cu mase din ce în ce mai mari. În acest mod cîmpul magnetic, prin focalizarea ionilor pozitivi cu aceeaşi energie cinetică îi clasifică şi diferențiază în fascicule după raportul *m/z*.

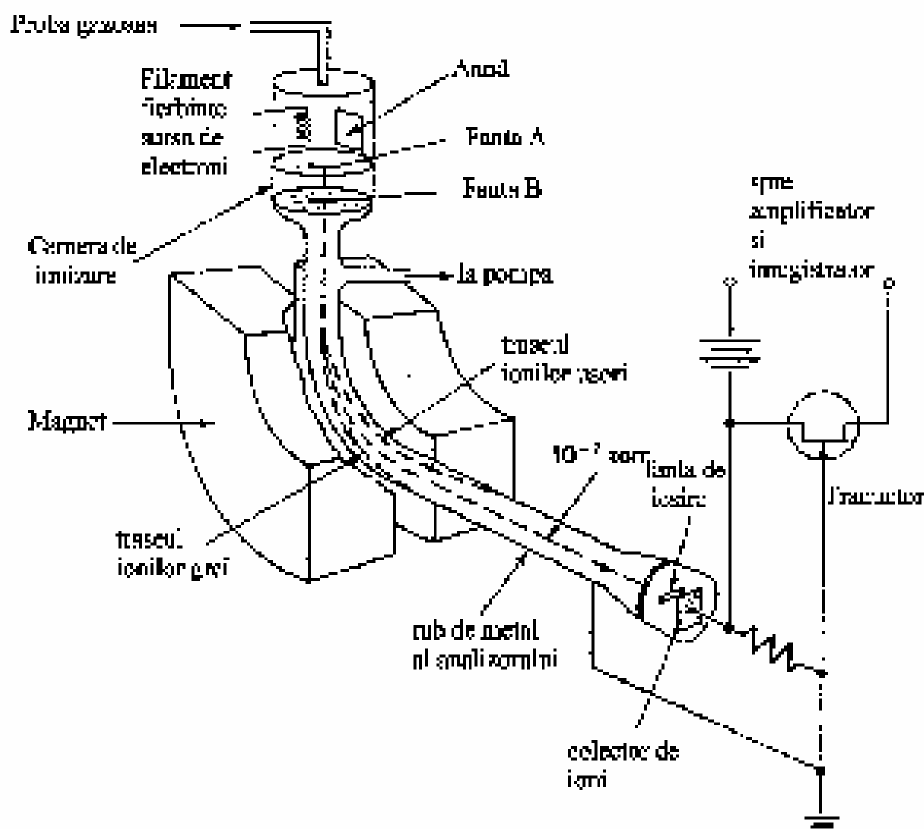


Figura III.5 Schema unui analizor magnetic cu un singur fascicol

În general rezoluția unui spectrometru cu o singură focalizare este dată de relația :

$$R = \frac{r}{s + w} \qquad (III.12)$$

unde: *r* este raza de curbură a tubului analizor ;

s şi *w* sunt diametrele fantelor de intrare şi ieşire din tubul analizor.

Practic puterea de rezoluție a acestor spectrometre este mai mică decît 10000. Pentru decelarea defectelor de masă mici, în cazul unor fragmente grele, această rezoluție este insuficientă.

Spectrometrele cu o înaltă rezoluție sunt cele cu dublă focalizare (Figura III.6), în care fascicolul de ioni de la sursă, este mai întîi focalizat printr-un analizor electrostatic, care micşorează practic dispersia energiilor ionilor şi apoi aceştia sunt

focalizați într-un analizor magnetic, care realizează separarea ionilor în funcție de raportul *m/z*.

Pentru ca două fragmente cu *m/z* identice să iasă exact în acelaşi timp din analizor, acestea trebuie să aibă energii cinetice, respectiv viteze strict egale, la intrarea în tub.

Datorită producerii ionizării la distanțe diferite de sistemul de accelerare, precum şi a vitezelor de translație diferite ale moleculelor înainte de ionizare, energiile lor cinetice diferă între anumite limite. Din acest motiv ionii cu acelaşi *m/z* nu vor focaliza exact în acelaşi punct, iar picurile oținute se vor lăți, conducînd în cazul a doi ioni de mase M şi $M+\Delta M$ la suprapunerea mai mult sau mai puțin avansată a lor, în funcție de valoarea raportului $M/\Delta M$.

Începînd de la o anumită valoare a acestui raport cele două semnale se vor suprapune complet.

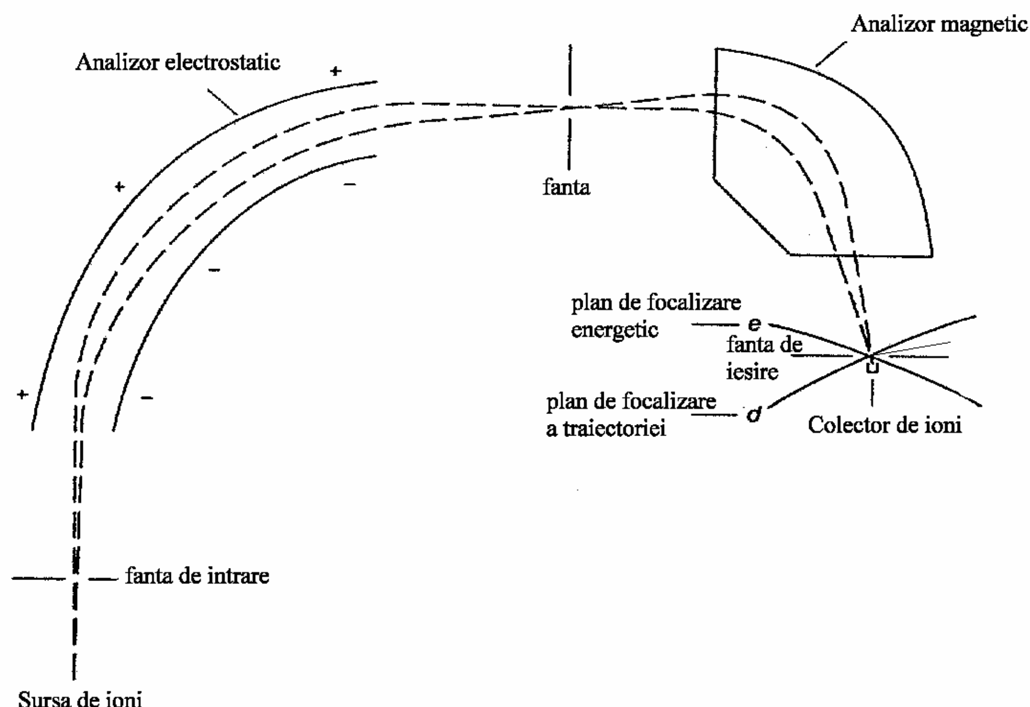


Figura III.6. Schema de principiu a unui spectrometru de masă cu dublă focalizare de tip Niler-Johnson

Pentru decelarea acestor ioni, ar trebui ca înainte ca ionii să ajungă la analizorul de masă, aceştia să fie separați în fascicule cu energii cinetice diferite. Aceasta se realizează prin trecerea fascicolului de ioni, după accelerare, printr-un cîmp electrostatic produs de armăturile curbe ale unui condensator (Figura III.6).

Raza de curbură a fascicolului de ioni în cîmpul electrostatic este:

$$r_c = \frac{2 \cdot V}{U} \qquad \text{(III.13)}$$

unde U este tensiunea dintre plăcile condensatorului şi V este potențialul de accelerare al ionilor. Se poate observa că în realția III.13 nu apare masa ionului, deci rezultă că traiectoria unui ion , pentru un U dat, depinde numai de V şi prin

urmare numai de energia eV a ionului respectiv. În acest mod cîmpul electrostatic, denumit şi analizor electrostatic, clasifică ionii numai funcţie de energia lor. Variind potenţialul de accelerare, vor ajunge la fanta de intrare în analizorul magnetic numai ionii ce posedă aceeaşi energie (prima focalizare). Analizorul magnetic va separa în continuare aceşti ioni funcţie de masa *m/z* (a doua focalizare).

Spectrometrele cu dublă focalizarea au o rezoluţie de cca 70.000.

Un alt tip de spectrometru de masă foarte răspîndit în tehnică GC/MS, este spectrometrul cu "timp de zbor" sau spectrometrul impuls (Figura III.7).

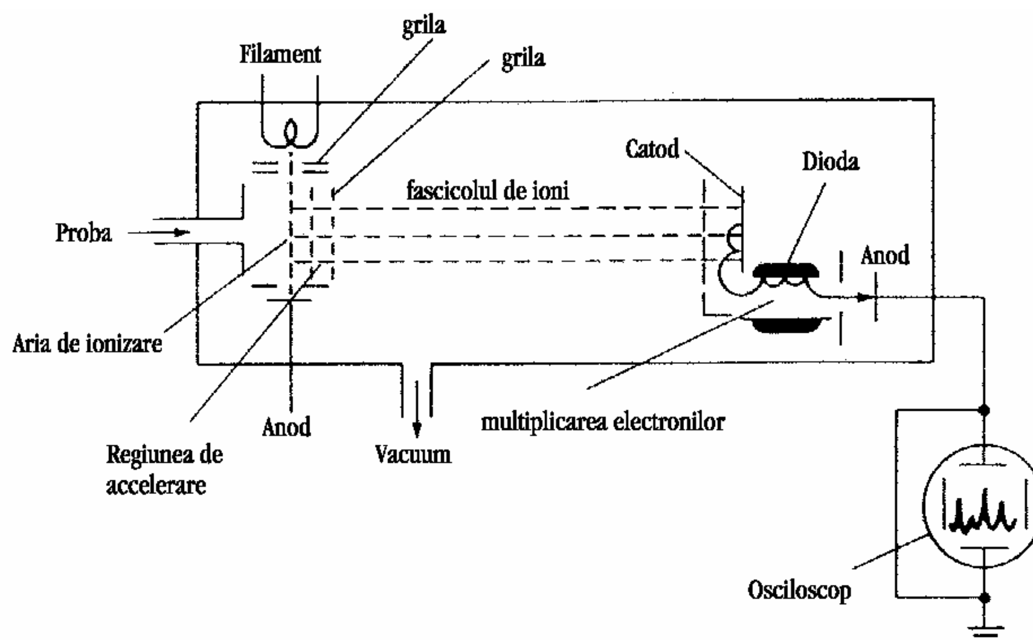


Figura III.7. Schema unui spectrometru cu "timp de zbor"

Prin iradierea intermitentă şi instantanee (~ 2μs) a probei cu un fascicol de electroni, se formează pulsuri de ioni cu aceeaşi energie cinetică. Aceşti ioni "zboară" printr-un tub rectiliniu vidat, de o anumită lungime (cca. 1m). Timpul de zbor din punctul de pornire pînă la colector este dat de expresia:

$$t_z = \frac{s}{v} \qquad \text{(III.14)}$$

unde: *s* este spaţiul de zbor şi *v* viteza.Ţinînd cont de relaţia III.3 obţinem:

$$t_z = s\sqrt{\frac{m}{2zV}} \qquad \text{(III.15)}$$

Menținînd constante *s* şi *V* pe tot parcursul efectuării spectrului, t_z se poate scrie ca fiind:

$$t_z = K\sqrt{\frac{m}{z}} \qquad \text{(III.16)}$$

unde $K = s\sqrt{\frac{1}{2V}}$

Timpul de zbor fiind proporțional cu *m/z,* vor ajunge primii la detector, ionii care au masa cea mai mică. Puterea de rezoluție a acestor aparate este de cca. 1500. Viteza mare de efectuare a spectrului generează condiții optime de cuplare cu cromatografele de gaze.

În ultimul timp linia tehnologică de producere a aparatelor de tip GC/MS s-a concentrat în utilizarea ca detectori pentru spectrometrul de masă, a unor sisteme mai compacte şi mai exigente privind scanarea şi decelarea fragmentelor ionice ale probei ionizate, şi anume analizorul quadrupol şi analizorul "ion trap".

Analizorul quadrupol (Figura III.8) funcționează ca un "filtru de masă", avînd un principiu de funcționare complet diferit față de analizoarele magnetice. Acest tip de analizor, are avantajul unui timp de scanare foarte mic (mai mic de 100 ms), ceea ce îl face foarte util pentru tandemul GC/MS, permițînd scanarea timpilor reali ai picurilor cromatografice. Este similar cu monocromatoarele utilizate în spectrometria optică, deoarece permite transmiterea la detector numai a ionilor cu *m/z* foarte aproiate, în timp ce ceilalți ioni sunt neutralizați şi transportați în altă direcție, ca molecule neutre.

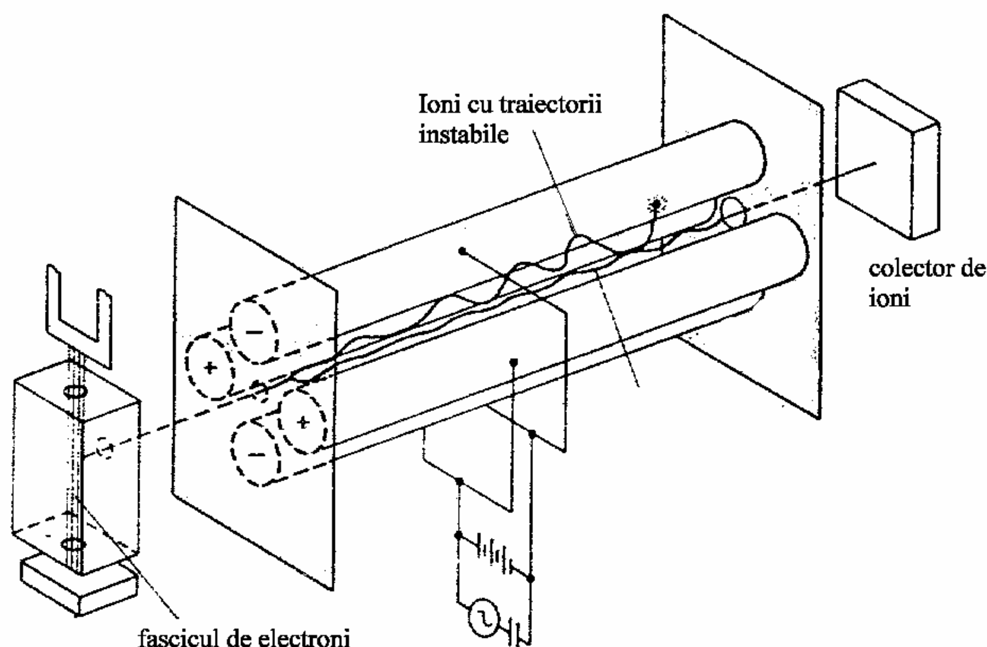


Figura III.8. Schema unui detector tip quadrupol.

Prin variația curentului electric ce trece prin analizor este posibilă transmiterea unui pachet de ioni cu *m/z* variabile, astfel putîndu-se realiza spectrul de masă prin scanare.

Analizorul este alcătuit din patru electrozi cilindrici conectați şi dispuşi paralel, într-o arie circulară sau hiperbolică (cazul ideal), conectați la o sursă de radio frecvență (RF) şi curent continuu (CC). Electrozii opuşi au aceeşi polaritate. Mişcarea ionilor în interiorul acestor electrozi poate fi descrisă cu ajutorul unei ecuații diferențiale de ordinul II (realația III.17).

$$\frac{d^2x}{dt^2} - \frac{2 \cdot z}{m \cdot r^2}(U + V_0 \cos\omega \cdot t)x = 0 \quad \text{(III.17)}$$

unde termenul $V_0 \cos\omega \cdot t$ caracterizează sursa de radiofrecvență şi U este curentul de la sursă.

Această ecuație este un exemplu tipic de ecuație tip Mathieu, pentru care forma generală este:

$$\frac{d^2x}{d\gamma^2} - (a_x + 2q\cos 2\gamma)x = 0 \qquad \text{(III.18)}$$

unde γ este o funcție de timp ($\omega t/z$).Această ecuație are următorele soluții:

$$a = 8zeU/mr^2\omega^2 \qquad \text{(III.19)}$$

$$q = 4zeV/mr^2\,\omega^2 \,\text{(III.20)}$$

cu precizarea că *2r* reprezintă spațiul dintre electrozilor.

Parametrii *a* şi *q* sunt folosiți mai ales în partea de construcție, în aşa fel încît să se stabilească şi să se definescă exact spațiul în care ionii au o traiectorie stabilă. Relația dintre cei doi parametrii şi raportul *m/z* se poate vedea printr-o reprezentare grafică într-un sistem de coordonate *a* şi *q* (Figura III.9). Masele din interiorul ariei haşurate sunt transmise la detector iar masele din afara acestei regiuni sunt pierdute, fie prin căderea lor direct pe electrozii quadrupolului , fie trecînd printre aceştia.

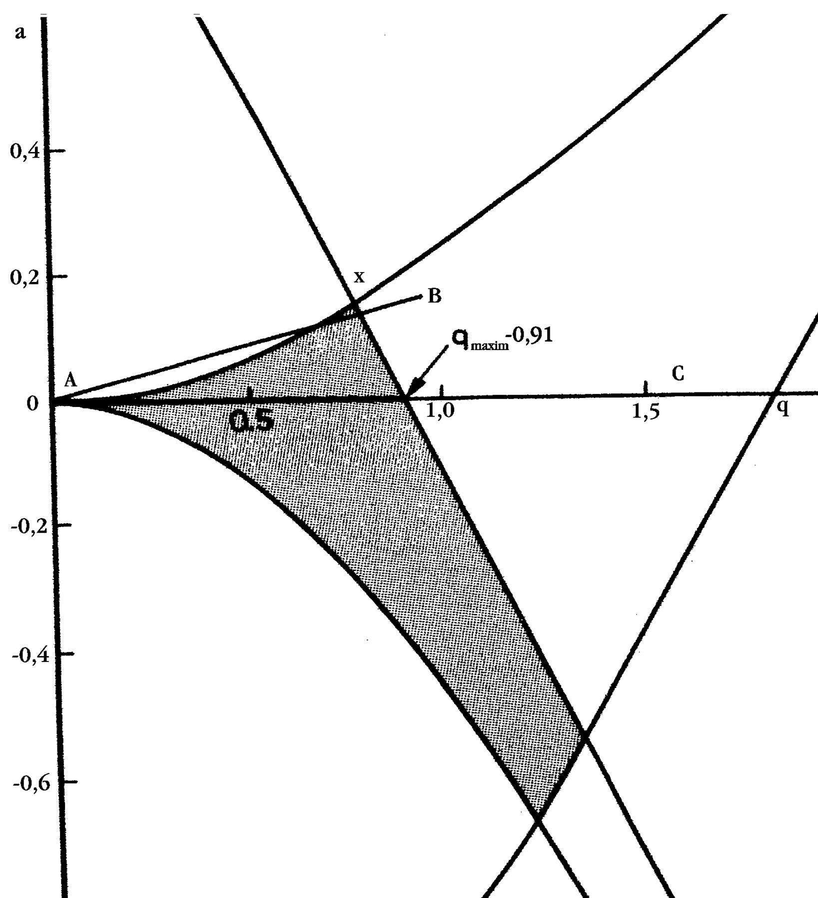


Figura III.9. Diagrama stabilității pentru analizorul quadupol şi "ion trap"

În interiorul acestei regiuni, valorile *m/z* cresc odată cu scăderea lui *a* iar la *a* =0 (în acest caz operează doar sistemul de radio frecvență) sunt transmise toate masele. Maximul diagramei (punctul X), este caracterizat prin îndeplinirea condiției de rezoluție maximă, deoarecece în aceste condiții sunt transmise doar cîteva mase.

Dacă s-ar lucra în condițiile date de acest maxim, ar trebui să se aleagă practic între transmiterea tuturor ionilor şi între o rezoluție înaltă. În cazul analizorului quadrupol puterea de rezolvare este o simplă multiplicarea a masei (de obicei 2m), astfel că acest analizor este în esență un dispozitiv cu rezoluție medie. Linia de scanare (AB), reprezintă intervalul în care variind *U* şi *V* în aşa fel încît raportul acestora să rămînă constant, ionii ajunşi în spațiul quadrupolului au o traiectorie stabilizată şi direcționată spre detector. Analizoarele tip quadrupol, pot separa şi mase peste 3000-4000 *m/z*. Aceste instrumente separă ionii ca diferențe de masă printr-o unitate.

Progresele în tehnologia "ion trap" au revoluționat tehnica şi aparatura în sistemele integrale de tipul CG/MS. În mecanismul "ion trap" (Figura III.10) anionii şi cationii în fază gazoasă pot fi formați şi menținuți pentru un inteval de timp, cu ajutorul unui cîmp electric şi /sau magnetic. În ultimul timp au fost realizate mai multe tipuri de astfel de analizoare, dar dintre toate *doar două* sunt curent utilizate în spectrometrele de masă. Dintre acestea ca detector în tehnica cuplată GC/MS se foloseşte analizorul "ion trap" simplu.

Practic analizorul ion trap este un analizor quadrupol în două dimensiuni. De altfel principiul de funcționare poate fi explicat tot cu ajutorul relației III.18, cu referire la parametrii *a* şi *q* ce caracterizează diagrama de stabilitate (Figura III.9).

Acest tip de analizor constă din cîte două perechi de electrozi de forme diferite şi roluri diferite (doi electozi circulari şi doi electrozi "end-cap"). Ionii sunt formați în interiorul "capcanei" prin pulsuri electronice generate de un filament, şi sunt

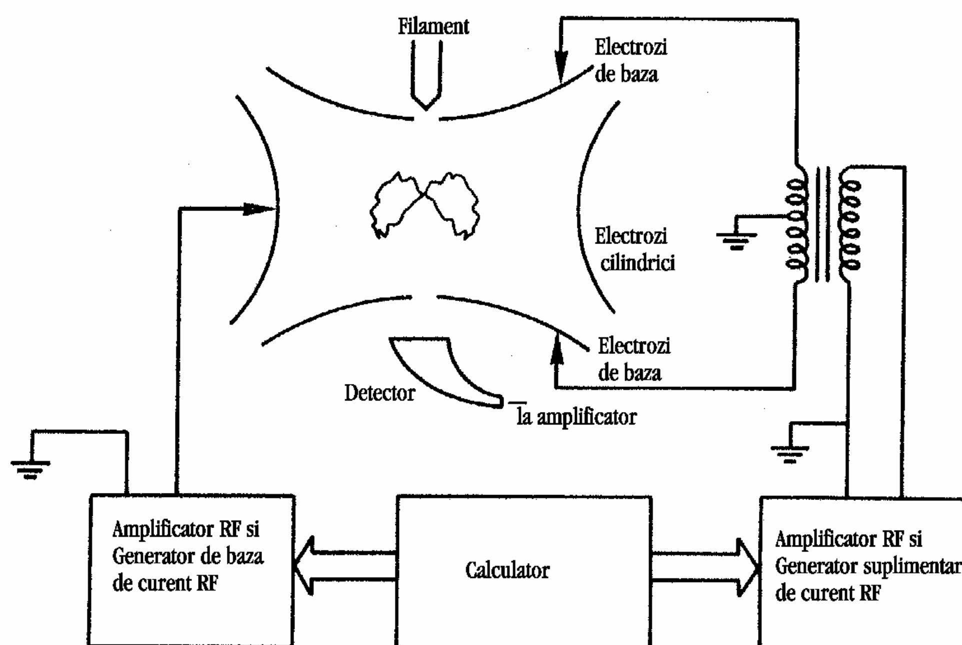


Figura III.10. Shema unui analizor "ion trap"

reținuți în această regiune stabilă (în lungul liniei a=0). Spectrul de masă este obținut prin generarea condiției de instabilitate, prin creşterea potențialului V, fiecărui ion, peste valoarea de stabilitate (q = 0,91- linia de scanare AC). Astfel, ionii sunt eliminați secvențial prin unul din electrozii "end-cap" direct spre detector. Aceasta este în contrast cu modul de operare al quadrupolului, unde ionii după ce urmează traiectorii stabile sunt detectați. Prezența unui gaz purtător la o presiune de cca 10^{-3} torri, ajută la menținerea unei rezoluții adecvate (He, folosit drept fază mobilă pentru cromatografia de gaze capilară este foarte bun în acest scop) În trapă este posibilă şi producerea reacțiilor de ionizare chimică[3]. Astfel, reactivul gazos de ionizare chimică este introdus la o presiune relativ joasă şi plasma formată poata fi ținută în trapă pentru o perioadă mai mare de timp.

III.2.2.4. Detectorii de ioni.

Cei mai utilizați detectori în spectrometrul de masă se bazează în general pe fenomenul de multiplicare electronică (Figura III.11).

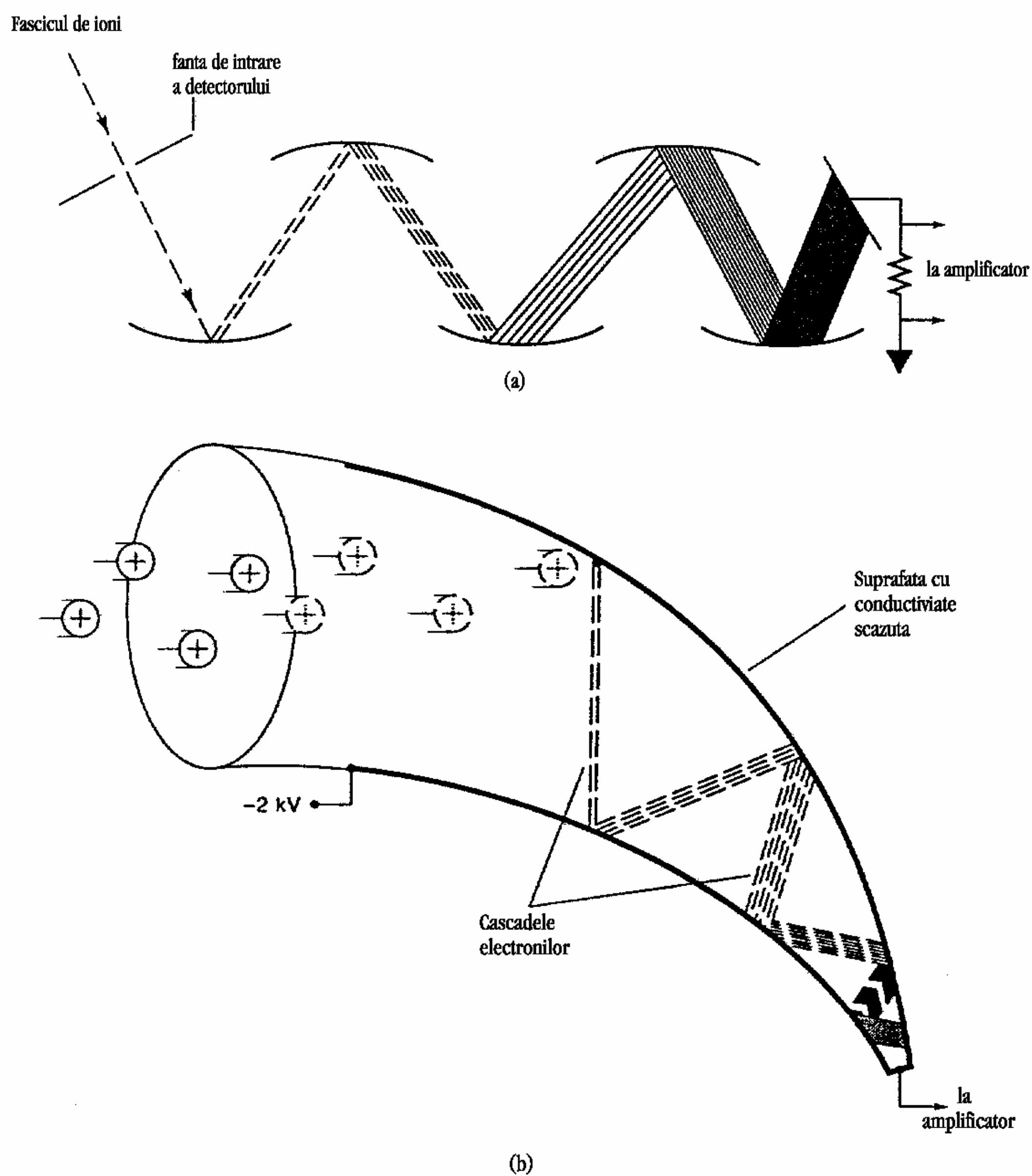


Figura III.11. a) detector cu şir discret de diode

b) detector cu diodă continuă

Acestea pot fi constituite fie dintr-un şir discret de diode, fie din diode continue. Ambele tipuri utilizează emisia de electroni secundari pentru amplificarea semnalului dat de ioni.

O serie de diode pe baza unor alije de Be-Cu (în mod obişnuit 12-20) sunt aranjate aşa cum este prezentat în figura III.11. Fascicolul de ioni ajunge pe prima diodă din această serie discretă, şi produce electroni secundari, care sunt acceleraţi către următoarea diodă producîndu-se astfel o cascadă de electroni secundari,care sporesc cu mult semnalul ionic iniţial. Diodele sunt menţinute la un potenţial pozitiv prin intermediul unei reţele de rezistori. Curentul obţinut este apoi convertit şi trimis la un amplificator.

Amplificatorul este de asemenea constituit dintr-un sistem de diode, fiecare dînd naştere uneii emisii de electroni (multiplicatori electronici). După amplificare, curentul obţinut este trimis la un sistem de procesare şi conversie, urmînd ca apoi să se înregistreze spectrul propriu-zis. Vizualizarea spectrului rezultat se poate face fie prin intermediul unui înregistrator, fie cu ajutorul ecranului unui calculator.

IIII.2.2.5. Tipuri de interfeţe pentru sistemul GC/MS

Partea cea mai importantă pentru aceste categorii de sisteme este interfaţa care realizează legătura dintre cele două instrumente. Problemele care apar în interpunerea coloanei cromatografice la spectrometrul de masă sunt legate de diferenţele de curgere ale gazelor purtătoare din cele două instrumente şi de necesitatea obţienrii unor informaţii despre probe în afară interferenţelor date de faza mobilă în care aceasta este diluată. Sistem integral GC/MS este unul din cei mai favorizaţi în această privinţă, deoarece, de multe ori faza mobilă (comună în multe cazuri) nu înfluenţează observarea spectrelor, şi existenţa probei în fază gazoasă, este compatibilă cu varietatea tehnicilor de ionizare utilizate în spectrometria de masă.

Prima incompatibilitate în acest caz este diferenţa de presiune la care lucrează cele două instrumente. Astfel, introducerea probei în coloana

cromatografică se face la presiunea atmosferică iar sursele de ionizare din spectrometru operează de regulă în intervalul 2-10^{-5} torri, pentru ionizarea chimică şi respectiv, electronică.

De aceea interfaţa trebuie să fie capabilă să realizeze o scădere adecvată a presiunii între cele două instrumente şi de asemenea să sporească trecerea probei menţinută în fază mobilă în raport cu presiunea de operare a sursei de ionizare. Interfaţa ar trebui să nu permită introducerea unui volum suplimentar de gaz purtător de la coloana cromatografică şi în acelaşi timp să nu degradeze sau să modifice chimic constituienţii probei. Spectrometrele de masă moderne cu sistem de vacuum diferenţial, permit utilizarea unor coloane în care vitezele de curgere spre sursele de ioni variază între 1-2 mL/min. Aceste viteze de curgere sunt compatibile cu cele corespunzătore coloanelor tubulare deschise din cromatografia de gaze, dar sunt mai mici decît vitezele tipice ale coloanelor tip pachet.

Au fost realizate mai multe tipuri de interfeţe care îndeplinesc destul de bine condiţiile mai sus menţionate. Utilizarea acestora în sistemul GC/MS depinde în mare măsură de circumstanţele experimentale. Coloanele care asigură debite de 1-2 mL /min, spre sursa de ioni sunt compatibile cu sistemele de vacuum ale spectrometrelor de masă moderne. Acestea sunt, de asemenea, debite optime pentru coloanele capilare deschise de tip tubular, de dimensiuni convenţionale şi de aceea cuplarea unor asemenea coloane la un spectrometru de masă prezintă foarte puţine probleme. Datorită flexibilităţii, inerţiei chimice şi rezistenţei crescute, coloanele din silice topită cu fază imobilizată, adeseori sunt cuplate direct la sursa de ioni prin intermediul unui dispozitiv foarte simplu de cuplare la vid şi unui suport pentru susţinerea coloanei. Acest dispozitiv permite ajustarea poziţiei coloanei faţă de sursa de ioni pentru obţinerea unei ionizari eficiente. Proba este transferată cantitativ la sursa de ionizare, dar performaţa coloanei capilare poate fi compromisă de căderea de presiune, timpii de reţinerea ai componenţilor variind cu modificarea presiunii sursei.

O altă modalitate de realizare a cuplării între cele două instrumente se bazează pe un reductor al debitului la intrarea în spectrometrul de masă şi a unei

valve speciale care acționează ca un divizor de debite. Această interfață este mult mai viabilă decît cea descrisă anterior deoarece poate opera cu o varietate de viteze de curgere, permițînd schimbarea coloanelor cu uşurință şi sunt prevăzute cu o cale secundară de îndepărtare a unor volume mari de solvenți sau reactivi corozivi din spectrometrul de masă. Dezavantajele acestor interfețe sunt date de posibilitatea introducerii unui volum suplimentar de gaz purtător precum şi de posibilitatea degradării compuşilor termic instabili, pe suprafețele metalice fierbinți ale valvelor. De cele mai multe ori este preferabilă utilizarea unor sisteme de cuplare de tip “open split” în locul interfețelor de tip valvă. Interfața de tip “open split” în esență constă dintr-un tub cu volum suplimentar mic, interpus între coloana capilară sau reductorul capilar şi spectrometrul de masă, formînd practic o fantă de trecere între cele două instrumente. În unele cazuri reductorul capilar pentru spectrometru, are un diametru foarte apropiat cu cel al diametrului interior al coloanei cromatografice astfel că este posibilă cuplarea directă a celor două capilare printr-o simplă etanşeizare. Acest fapt face posibilă o minimalizare a proceselor de adsorbție la interfață şi înlătură fenomenul de diluție realizat de eluentul coloanei în reductorul capilar al spectrometrului. Acest tip de cuplare permite menținerea unei viteze de curgere constantă a gazului purtător de la coloană cromatografică, independentă de viteza de curgere prin aceasta. În aceste condiții, cantitatea de probă care intră în spectrometru depinde de raportul dintre viteza de admisie în sursa de ionizare, (care este fixat în functie de capacitatea de admisie a capilarei cromatografice, de conductanța sursei, de temperatură şi de gazul purtător) şi viteza de curgere în coloana cromatografică, a eluentului.

Întreaga cantitate de probă este transferată în spectrometrul de masă doar dacă viteza de curgere la ieşirea din coloana cromatografică este egală cu viteza de curgere la intrarea în reductorul capilar al spectrometrului. Dacă viteza de curgere din coloană este mai mare decît la intrarea în sursa de ionizare, o parte din probă este pierdută la interfață şi nu mai ajunge în spectrometru. Dacă viteza de curgere este mai mică, apare fenomenul de diluție prin creşterea cantității de gaz intrat in spectrometru, iar masa de probă ajunsă la sursa de ionizare este mult mai redusă.

Interfața poate opera ca o fantă conectată la un detector secundar. Un alt avantaj al interfeței de tip "open split" este dat de faptul că, întotdeauna capătul coloanei se află la presiune atmosferică ceea ce face ca timpii de reținere să fie reprobuctibili. Aceste tipuri de interfețe au o fiabilitate mare, permițînd utilizarea mai multor tipuri de coloane şi diferite viteze de curgere. Coloanele pot fi uşor schimbate fără a afecta parametrii de funcționare ai spectrometrelor de masă. Cantitatea de probă care rămîne la interfață este constanã indiferent de programul de temperatură folosit pentru separare, dacă viteza de curgere a gazului purtător este foarte atent controlată prin intermediul unui "flow controler", şi dacă interfața este încălzită cu aceeaşi viteză ca şi coloana cromatografică (interfață se găseşte în termostatul cromatografului de gaze). Practic interfața trebuie să aibă un rol de separator molecular.

Performațele separatorilor moleculari sunt date de eficiența (Y) şi capacitatea de separare (N) a acestora. Eficiența este definită ca raportul dintre cantitatea de probă intrată în spectrometru şi cea intrată în coloană (în procente), şi reprezintă capacitatea acestora de a permite trecerea probei în interiorul sursei de ionizare a spectrometrului. Factorul de separare (N) este definit ca raportul dintre concentrația probei în faza mobilă la intrare în spectrometru, şi concentrația probei în faza mobilă la intrare în coloana de separare. Factorul de separare variază în raport cu tipul de separator folosit, cu viteza de trecere a fazei mobile prin coloana cromatografică şi depinde de eficiența sistemului de vacuum a sursei de ionizare şi de masa moleculară a probei. Între cei doi factori ce caracterizează performața unui separator molecular, există relația :

$$N = (Y/100)(V_{GC}/V_{MS}) \qquad \text{(III. 21)}$$

unde V_{GC} este volumul fazei mobile care intră în coloana cromatografică şi V_{MS} volumul gazului purtător la intrarea în spectrometru.

Cei mai obişnuiți separatori moleculari utilizați în acest sistem integral sunt separatorul prin efuzie (Watson-Biemann), separatorul tip jet şi separatori cu membrane(Figura III.12).

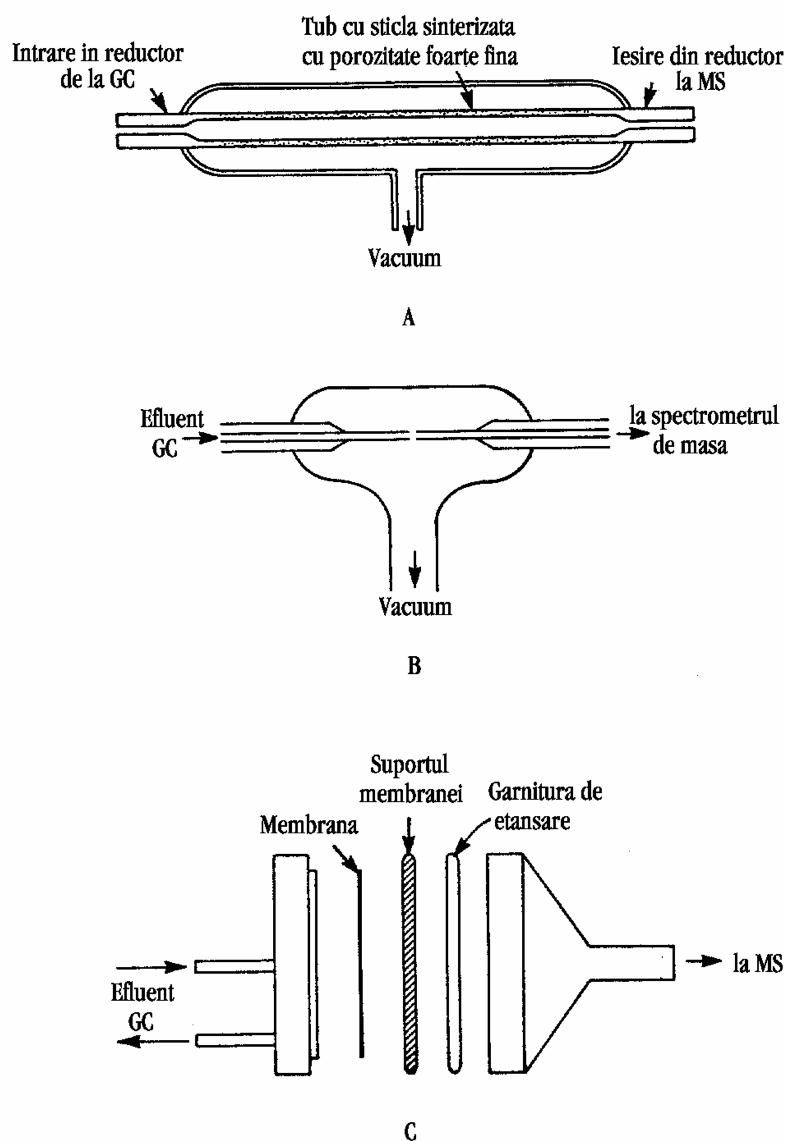


Figura III.12 Tipuri de interfețe utilizate în sistemele integrale GC/MS.
A) Separator prin efuzie; B) Separator tip jet; C) Separator membrană.

Separatorul Watson-Biemann, constă dintr-un tub de sticlă sinterizată cu o porozitate ultrafină, introdusă într-o incintă vidată şi termostatată. Tubul este prevăzut cu capilare din sticlă la ambele capete prin intermediul cărora se realizează reducția debitului de gaz purtător. Presiunea din interiorul incintei este

de cîţiva torri şi debitul la care proba efuzează prin porii fritei este invers proporţională cu masa moleculară la 1/2 şi proporţională cu presiunea parţială a fiecărui component din probă.Variind viteza de curgere a gazului purtător prin acest tub, se poate realiza o separare a probei din faza mobilă, probă care ajunge apoi la spectrometrul de masă. Separarea în acest caz este influenţată atît de temperatură cît şi de debit, optimizarea acestor parametri făcîndu-se empiric.

Separatorul tip jet este foarte mult utilizat în cazul separatorilor cu pachet de coloane. Efluentul de care vine de la cromatograf este obturat prin intermediul unui orificiu foarte fin, cînd practic el expandează în interiorul unei camere vidate încălzite. În timpul acestui proces de expandare, moleculele gazului purtător difuzează rapid, departe de centrul jetului “supersonic”, separîndu-se de moleculele mai grele ale probei. Poziţia şi diametrul acestui orificiu, precum şi spaţiul relativ de expansiune al jetului sunt deosebit de importante pentru o separare corespunzătoare. Normal acest separator este realizat într-o manieră care permite obţinerea un maxim de separare doar pentru debite apropiate ale gazului purtător, în ambele instrumente.

Seperatorul cu membrană siliconică funcţionează pe principiul permeabilităţii diferenţiate, dintre moleculele solutului organic şi a gazului purtător. Cantitatea de probă transmisă prin membrană este direct proporţională cu solubilitatea şi difuzia solutului prin membrană, cu aria membranei, cu presiunea de la suprafaţa membranei şi invers proporţională cu grosimea membranei. Trecerea moleculelor organice prin memebrană, poate fi cu două ordine de mărime mai mare decît a moleculelor gazului purtător.

Suprafaţa membranei care vine în contact direct cu eluentul gaz cromatografic, este expusă la o presiune ridicată. Pentru a nu periclita rezoluţia coloanei cromatografice înainte de a ajunge la membrană, eluentul este mai întîi introdus într-o cameră mică care vine în contact direct cu membrana. Rolul acestei cavităţi este de a minimaliza presiunea la suprafaţa membranei. Suprafaţa membranei, grosimea şi timpul de contact sunt parametrii critici ai acestor membrane iar temperatura reprezintă un parametru operaţional deosebit de

important. O separare eficientă se obține la o temperatură relativ joasă a separatorului, însoțită totodată şi de menținerea integrității coloanei de separare.

Pînă în prezent nu s-a găsit un separator ideal pentru toate situațiile. Aşa cum se poate vedea şi în tabelul III.3, la prima vedere separatoarele tip membrană pot fi considerate ca fiind foarte utile. Acestea sunt caracterizate printr-un factor de separare destul de mare şi totodată permit coloanelor să funcționeze separat de spectrometru de masă, astfel că ambele instrumente pot fi optimizate individual.

Tabelul III.3
Performanțele separatorilor moleculari

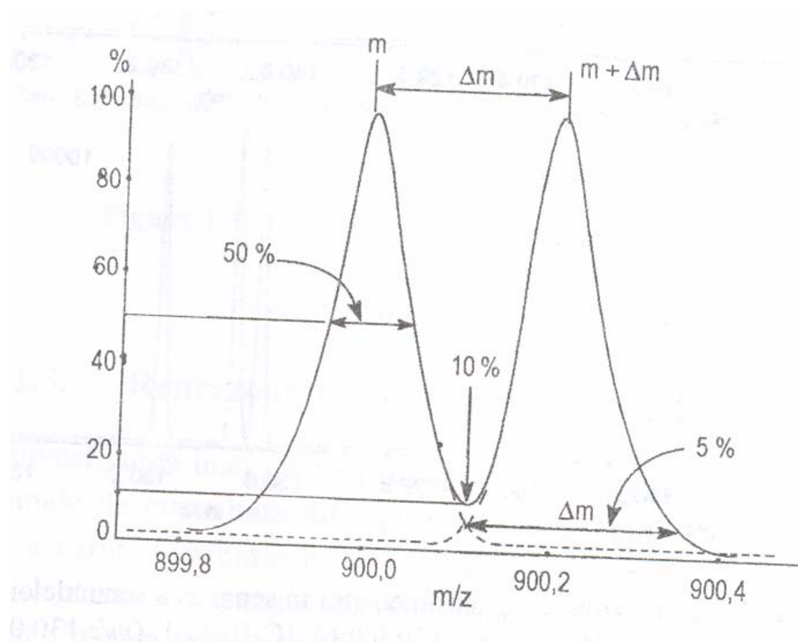
Proprietăți specifice	**Efuzie (Waston-Bieman)**	**Jet**	**Membrană**
Eficiența (%)	20-30	30-70	30-80
Factorul de separare	4-7	6-14	10-30
Viteza de curgere a gazului purtător (mL/min)	10-30	15-25	1-60
Temperatura. (limita superioară ^{0}C)	350	300	255

Din păcate, perfomanțele acestor membrane sunt critic influențate de temperatură. Acestea au o temperatură optimă de transmisie pentru fiecare compus organic prin secțiunea lor. La o temperatură mai scăzută decît temperatura optimă poate apare condiția de distorsionare a picurilor cromatografice iar operarea la o temperatură relativ joasă exclude practic analiza compuşilor cu o volatilitate scăzută. Separatoarele tip jet şi prin efuzie, necesită un echipament auxiliar de vacuum şi sunt eficiente doar pentru viteze de curgere apropiate pentru ambele instrumente.

IIII.2.2.6. Puterea de rezolutie a spectrometrelor de masa

Rezolutia in spectrometria de masa se refera la posibilitatea de a distinge ionii cu mase apropiate, respectiv un ion cu masa m, fata de unul cu masa m+Δm. Spectrometrele de masa cu rezolutii bune permit separarea semnalelor cu mase foarte apropiate.

Exista mai multe posibilitati de caracterizare a rezolutiei unui spectrometru de masa, cea mai des intalnita fiind ca raport m/Δm, unde m este masa ionului al carui semnal il consideram si Δm diferenta de masa, respectiv distanta fata de un semnal vecin de aceeasi intensitate cu care se intrepatrunde, astfel incat minimul curbei se situeaza la 10% din inaltimea celor doua semnale.



In figura de mai sus m = 900 si Δm = 0,208, ceea ce determina o rezolutie m/Δm = 4327. Rezolutia se mai poate exprima si in functie de un singur semnal, respectiv largimea acestuia la 5% sau 50% din intensitate, iar in cazul instrumentelor TOF si a celor cu trapa de ioni se ia in calcul largimea semnalului la jumatate din intensitatea maxima.

In functie de rezolutie, spectrometrele pot fi:

-cu rezolutie scazuta (m/Δm~ 200);

- cu rezolutie medie (m/Δm= 500-5000);

- cu rezolutie inalta (m/Δm >10000) –permit determinarea masei moleculare exacte.

Pentru a separa doua molecule cu masele de 400 si 401, este nevoie de un aparat cu rezolutia de $m/\Delta m = 400/1 = 400$.

Pentru a separa semnalele O_2 (M = 31,9898) si S (M = 31,9721): Δm = 0,0177, deci necesita un aparat cu o rezolutie $m/\Delta m$ = 31,9898/0,0177 = 1806.

Pentru a separa semnalele $C_8H_{13}N$ (M= 123,094799) si $C_7H_{11}N_2$ (M= 123,092223): Δm = 0,002576, deci este necesar un aparat cu o rezolutie $m/\Delta m$ = 123,094799/0,002576 = 47748.

III.3. Monitorizarea datelor în spectrometria de masă

Cele mai moderne spectrometre de masă cu sistem de introduce a probelor tip coloană cromatografică sunt prevăzute cu calculatoare de mare putere sau microprocesoare.

Acestea sunt alcătuite din: sistemul de achiziție a datelor şi instrumentul de control; procesorul de date care permite realizarea: substragerii automate a backgroundului, normalizarea parametrilor, formatarea, calibrarea, tipărirea şi afişarea precum şi identificarea spectrelor de masă cu ajutorul metodei de căutare în banca de date din memoria calculatorului. Componentele tipice ale unui spectrometru de masă /sistem de date sunt prezentate în figura III.3.1.

Convertizorul digital analog (ADC) are rolul de a transforma semnalul primit de la amplificatorul spectrometrului într-un şir de semnale digitale discrete, compatibile cu procesorul calculatorului (conversia maselor şi intensităților). Aceste semnale sunt apoi sortate pentru editarea şi vizualizarea răspunsului, prin intermediul unui monitor, în timpul achiziționării datelor, asfel că procesele pe care le suferă proba pot fi uşor urmărite chiar în timpul analizei. De asemenea răspunsul poate fi tipărit prin intermediul unei imprimante, în diferite variante (spectrul de masă, mass-cromatogramă, tabel de date cu masele fragmentelor şi intensitatea curentului ionic total).

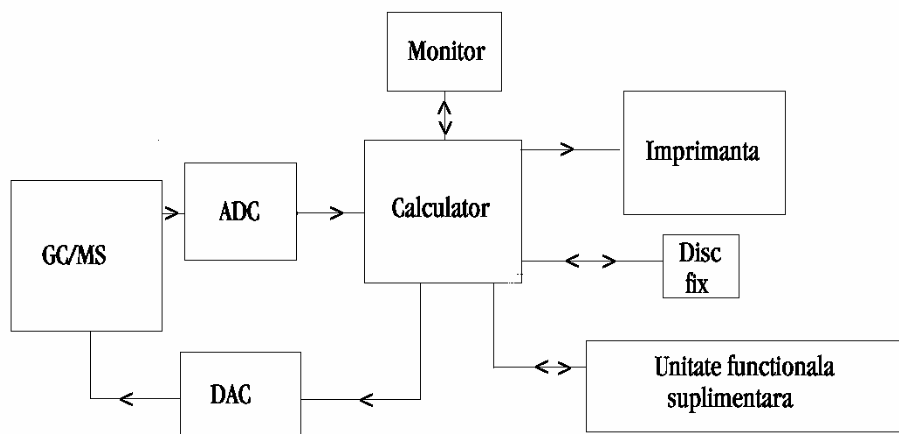


Figura III.3.1. Diagrama bloc a unui sistem GC/MS

Un astfel de sistem integral GC/MS, într-o singură operaţie poate genera cîteva sute de spectre de masă, cu acces consecvent şi rapid la placa de bază, în vederea înregistrării spectrelor de masă pentru procesări secvenţiale.

Multe din sistemele de date nu sunt doar simple unităţi funcţionale, pasive la informaţiile achiziţionate Aceste sisteme sunt prevăzute şi cu o unitate de control care operează în regim invers cu sistemul analog digital de conversie (DAC) făcînd practic posibilă trecerea instrucţiunilor de la calculator la spectrometrul de masă. Viteza de scanare, intervalul de masă studiat, rezoluţia, programul de temperatură pentru coloana cromatografică, modul de ionizare, viteza de curgere a gazului inert sunt doar cîţiva din parametrii operaţionali care pot fi selectaţi şi optimizaţi prin intermediul keyboardului calculatorului.

III.4. Interpretarea spectrului de masa

Un spectru de masa este o interpretare grafica a ionilor detectati de spectrometrul de masa. Spectrul apare sub forma unui grafic in axele de coordonate

x,y, unde pe axa x este redat raportu masa/sarcina (m/z) iar pe axa y intensitatea generata de ion. Odata inregistrat, spectrul de masa se analizeaza dupa anumite reguli, furnizind informatii importante cu privire la structura substantei analizate. In prima instanta se determina abundentele relative ale semnalelor prin masurarea inaltimilor lor, se identifica ionul molecular (acolo unde exista), picul de baza si principalele fragmente.

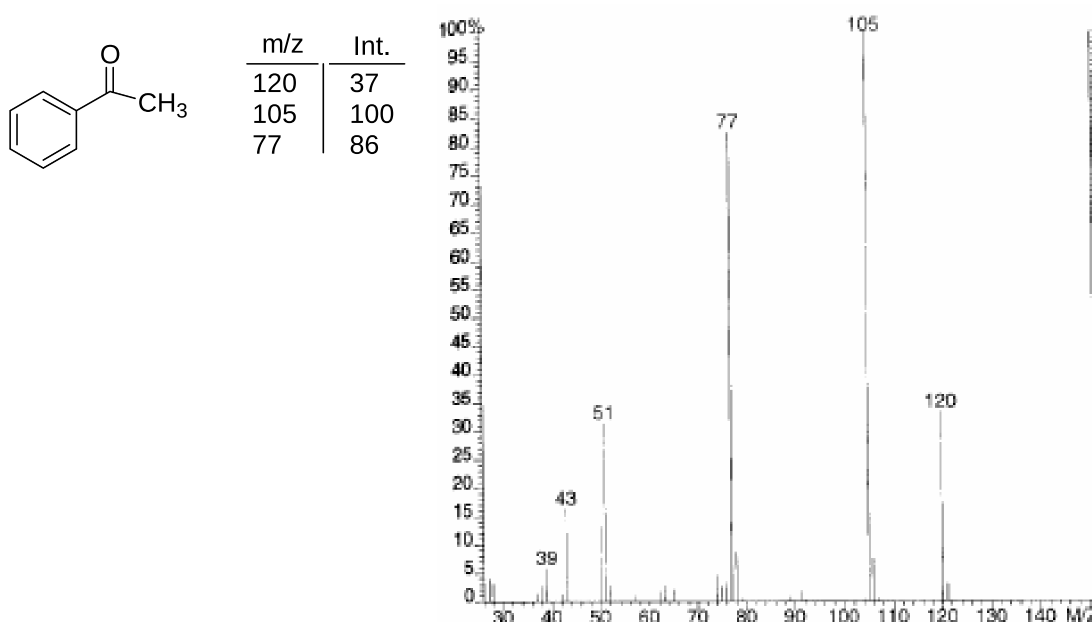
Picul de baza este semnalul cel mai intens si i se atribuie conventional valoarea 100%. El da indicatii asupra principalei reactii de fragmentare din molecula. Intensitatile celorlalte semnale se exprima in procente fata de picul de baza. De obicei, ultimul semnal important este *ionul molecular* (M), care ne da *masa moleculara* a substantei. Intotdeauna, dincolo de M, apar semnale si la M+1, M+2, si in unele cazuri si M+4, M+6, etc. Aceste semnale isi au originea in prezenta izotopilor mai grei in structura compusilor respectivi. Intensitatea acestor semnale se considera in raport cu intensitatea lui M, care de aceasta data se considera ca are valoarea 100.

Nu se vor omite o serie de semnale mici sau mijlocii care sunt caracteristice unor fragmente deosebit de importante pentru interpretarea spectrului (fragmente cheie).

Nu se omit de asemenea picurile furnizate de ionii metastabili si ionii dublu incarcati.

Regla azotului: o molecula a carei masa moleculara este un numar par trebuie sa contina un numar par (sau nul) de atomi de azot; o masa moleculara impara dovedeste ca in molecula avem un numar impar de atomi de azot.

In figura III.4.1. este prezentat spectrul de masa al acetofenonei, ca exemplu reprezentativ. Se observa ca ionul molecular apare in spectru la m/z 120, avind o intensitate mare (37%). Picul de baza (100%) apare la m/z 105 si se datoreste unei fragmentari alfa la nivelul gruparii functionale carbonil. Acelasi tip de fragmentare, dar in partea opusa a gruparii carbonil, explica si picul da la 77 (86%). Ionii cu intensitate mai mica de la m/z 51, 43 si 39 se datoresc fragmentarii nucleului aromatic.



m/z	Int.
120	37
105	100
77	86

Figura III.4.1. Spectrul de masa al acetofenonei

Se observa ca ionul molecular apare in spectru la m/z 120, avind o intensitate mare (37%). Picul de baza (100%) apare la m/z 105 si se datoreste unei fragmentari alfa la nivelul gruparii functionale carbonil, cind se genereaza un ion benzoil. Acesta din urma elimina o molecula neutra ce CO si genereaza picul intens de la m/z 77 (86%). Acest din urma pic se poate explica si printr-o fragmentari alfa tot la nivelul gruparii carbonil, dar in partea opusa fragmentarii anterioare (care explica si explica si picul da la mz 43). Ionii cu intensitate mai mica de la m/z 51 si 39 se datoresc fragmentarii nucleului aromatic, figura III.4.2.

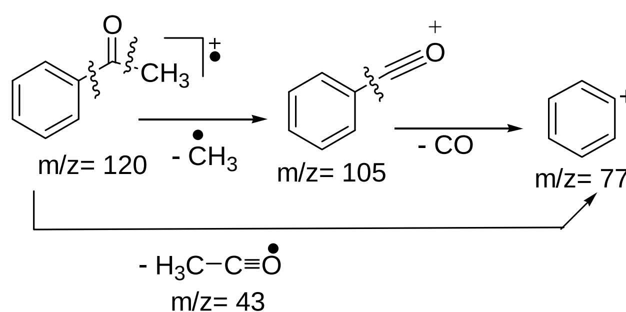


Figura III.4.2. Schema reactiei de fragmentare a acetofenonei

Tipuri de ioni

1. Ioni metastabili

In functie de propria energie, un ion cu masa m_1 format in camera de ionizare poate sa se comporte in urmatoarele moduri:

a) ajunge la detector fara a suferi procese de fragmentare si este detectat ca ion-radical cu masa m_1;

b) sufera un proces de fragmentare in interiorul camerei de ionizare, cu formarea unui ion m_2, care va fi detectat ca atare;

c) sufera procesul de fragmentare dar dupa accelerare si inainte de detectare. Astfel de ioni se numesc *ioni metastabili*, ca urmare a comportamentului lor din punct de vedere a stabilitatii, intermediar intre ionii de tip a) si b).

Ionii metastabili determina aparitia in spectru a unor semnale metastabile, corespunzatoare unei mase m^* data de expresia:

$$m^* = (m_2)^2/m_1$$

unde: m_1 –masa ionului initial;

m_2 – masa ionului nou format.

Ionii metastabili dau de obicei semnale de mica intensitate si semnalu este largit, ceea ce-i face usor de recunoscut in spectru si dau informatii cu privire la modul de fragmentare a unui compus, fig. III.4.3.

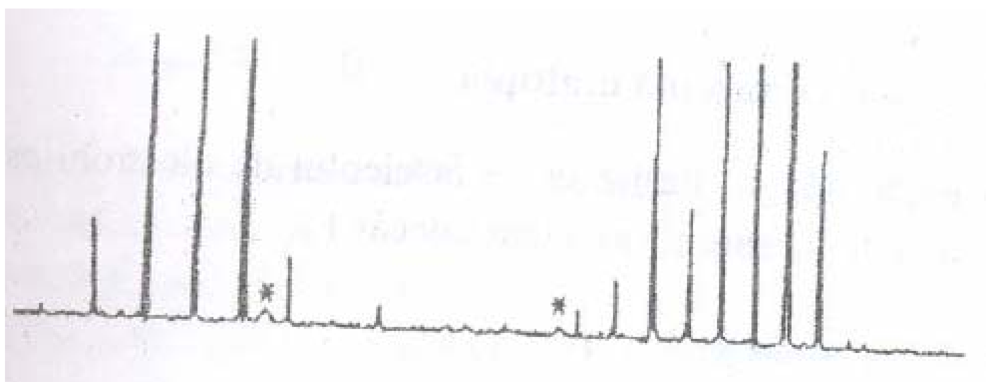
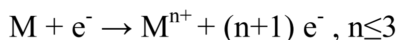


Figura III.4.3. Semnalele datorate unor ioni metastabili (*) in spectru EI-MS.

Din valorile lui m^*, tinand cont si de celelalte picuri existente in spectru, se pot determina valorile lui m_1 si m_2. Beynon a intocmit tabele cuprinzand toate perechile de m_1 si m_2 care corespund aceleeasi m^*, pentru valori cuprinse intre 1 si 500.

2. Ioni cu sarcina multipla

Atunci cand energia furnizata de fascicolul de electroni este suficient de mare, compusii cu electroni π sau p pot furniza ioni cu mai multe sarcini pozitive.



$M + e^- \rightarrow M^{n+} + (n+1)\ e^-$, $n \leq 3$

Cei mai importanti ioni sunt cei dublu incarcati, acestia putand fi recunoscuti astfel:

- cei cu mase impare vor furniza semnale la mase fractionare;
- cei cu mase pare vor furniza semnale datorate izotopului ^{13}C la 0,5 unitati de masa mai sus decat valoarea masei lor (exista un raport bine stabilit si intre intensitatile celor doua semnale).

Picuri izotopice

Aceste semnale isi au originea in prezenta izotopilor mai grei in structura compusilor respectivi. Izotopii vor intra in componenta moleculelor in aceeasi proportie in care sunt raspanditi in natura.

In tabelul de mai jos sunt prezentate abundentele relative ale elementelor ce intra in structura compusilor organici.

Abundenta naturala relativa a izotopilor satbili ai elementelor

Elements	A Isotope	Relative Abundance	A + 1 Isotope	Relative Abundance	A + 2 Isotope	Relative Abundance
Carbon	^{12}C	100	^{13}C	1.11		
Hydrogen	^{1}H	100	^{2}H	0.016		
Nitrogen	^{14}N	100	^{15}N	0.38		
Oxygen	^{16}O	100	^{17}O	0.04	^{18}O	0.20
Fluorine	^{19}F	100				
Silicon	^{28}Si	100	^{29}Si	5.10	^{30}Si	3.35
Phosphorus	^{31}P	100				
Sulfur	^{32}S	100	^{33}S	0.78	^{34}S	4.40
Chlorine	^{35}Cl	100			^{37}Cl	32.5
Bromine	^{79}Br	100			^{81}Br	98.0
Iodine	^{127}I	100				

Elementele care contribuie semnificativ la aparitia semnalelor M+1 sunt izotopii ^{2}H, ^{13}C, ^{15}N si ^{33}S, iar pentru semnalele M+2 sunt izotopii ^{18}O, ^{34}S, ^{37}Cl si ^{81}Br. Cum izotopii hidrogenului sunt in foarte mica proportie raspanditi in natura, se poate neglija influenta pe care o au asupra spectrelor de masa.

In general pentru o molecula cu n atomi de carbon, abundentele relative ale semanlelor M+1 si M+2, pot fi calculate prin rezolvarea binomului $(a+b)^n$,

Unde: a – abundenta izotopului ^{12}C

b – abundenta izotopului ^{13}C

Facand calcule pentru n=3 si impartind prin 10000 pentru ca suma lor totala sa fie 100, obtinem:

Ioni	M	M+1	M+2	M+3
Intensitati relative	96,712	3,25	0,0364	0,136 x 10^{-3}
Numarul atomilor de ^{13}C	0	1	2	3

Cu cit numarul de atomi de carbon (si de azot) din molecula este mai mare, cu atit abundenta maximului M+1 este mai mare, vezi tabelul de mai sus.

Asa dupa cum am mai spus, elementele care contribuie semnificativ la aparitia semnalelor M+2 sunt izotopii ^{18}O, ^{34}S, ^{37}Cl si ^{81}Br. Un compus care contine clor va contine un maxim M+2 cu o intensitate de aproximativ o treime din intensitatea ionului molecular M (comform abundentei izotopilor ^{35}Cl si ^{37}Cl), iar o substanta cu brom un maxim M+2 cu o intensitate aproape egala cu intensitatea ionului molecular M (abundenta izotopilor ^{79}Br si ^{81}Br este aproape egala).

In ceea ce priveste semnalele de la masele M+4, M+6, etc, acestea se datoreaza prezentei mai multor atomi de S, Cl sau Br si sunt prezentate in tabel in precente % fata de intensitatea ionului molecular.

Halogen prezent	M%	M+2	M+4	M+6
Br	100	97,7	-	-
Br_2	100	195,0	95,5	-
Br_3	100	293,0	186,0	93,4
Cl	100	32,6	-	-
Cl_2	100	65,3	10,6	-
Cl_3	100	99,8	31,9	3,47
BrCl	100	130	31,9	-
Br_2Cl	100	228	159	31,2
$BrCl_2$	100	163	74,4	10,4

Tinind cont de datele de mai sus pentru picuri izotopice si utilizind tabelele lui Beynon pentru formule moleculare posibile, se poate determina formula moleculara probabila pentru un compus.

Beynon a calculate valorile lui M+1 si M+2 pentru compusi continand in molecula C, O, H, N si cu mase mergand pana la 250. Calculele au fost facute atat pentru formule cu o anume semnificatie, cat si pentru formule care nu au o semnificatie rationala. In tabelul de mai jos sunt citeva exemple.

	M+1	M+2		M+1	M+2		M+1	M+2
C_3H_7N	3,74	0,05	CH_3O_3	1,25	0,60	$C_2H_2N_2O$	3,00	0,23
C_4H_9	4,47	0,08	CH_5NO_2	1,62	0,41	$C_2H_4N_3$	3,37	0,04
58			C_4HN	4,72	0,09	$C_3H_2O_2$	3,35	0,44
CNO_2	1,54	0,41	C_5H_3	5,45	0,12	C_3H_4NO	3,73	0,25
CH_2N_2O	1,92	0,21	**64**			$C_3H_6N_2$	4,10	0,07
CH_4N_3	2,29	0,02	CH_4O_3	1,26	0,60	C_4H_6O	4,46	0,28
$C_2H_2O_2$	2,27	0,42	C_4H_2N	4,74	0,09	C_4H_8N	4,83	0,09
C_2H_4NO	2,65	0,22	C_5H_4	5,47	0,12	C_5H_{10}	5,56	0,13
$C_2H_6N_2$	3,02	0,03	**65**			**71**		
C_3H_6O	3,38	0,24	C_3HN_2	4,02	0,06	CHN_3O	2,28	0,22
C_3H_8N	3,75	0,05	C_4HO	4,38	0,27	CH_3N_4	2,65	0,03
C_4H_{10}	4,48	0,08	C_4H_3N	4,75	0,09	C_2HNO_2	2,64	0,42
59			C_5H_5	5,48	0,12	$C_2H_3N_2O$	3,01	0,23
$CHNO_2$	1,56	0,41	**66**			$C_2H_5N_3$	3,99	0,04
CH_3N_2O	1,93	0,21	$C_3H_2N_2$	4,04	0,06	$C_3H_3O_2$	3,37	0,44
CH_5N_3	2,31	0,02	C_4H_2O	4,39	0,27	C_3H_5NO	3,74	0,25
$C_2H_3O_2$	2,29	0,42	C_4H_4N	4,77	0,09	$C_3H_7N_2$	4,12	0,07
C_2H_5NO	2,66	0,22	C_5H_6	5,50	0,12	C_4H_7O	4,47	0,28
$C_2H_7N_2$	3,04	0,03	**67**			C_4H_9N	4,85	0,09
C_3H_7O	3,39	0,24	C_2HN_3	3,32	0,04	C_5H_{11}	5,58	0,13
C_3H_9N	3,77	0,05	C_3HNO	3,68	0,25	**72**		
60			$C_3H_3N_2$	4,05	0,06	CH_2N_3O	2,30	0,22
CH_2NO_2	1,57	0,41	C_4H_3O	4,41	0,27	CH_4N_4	2,67	0,03
CH_4N_2O	1,95	0,21	C_4H_5N	4,78	0,09	$C_2H_2NO_2$	2,65	0,42
CH_6N_3	2,32	0,02	C_5H_7	5,52	0,12	$C_2H_4N_2O$	3,03	0,23
$C_2H_4O_2$	2,30	0,44	**68**			$C_2H_6N_3$	3,40	0,04
C_2H_6NO	2,68	0,22	$C_2H_2N_3$	3,34	0,04	$C_3H_4O_2$	3,38	0,44
$C_2H_8N_2$	3,05	0,03	C_3O_2	3,32	0,44	C_3H_6NO	3,76	0,25
C_3H_8O	3,41	0,24	C_3H_2NO	3,69	0,25	$C_3H_8N_2$	4,13	0,07
61			$C_3H_4N_2$	4,07	0,06	C_4H_8O	4,49	0,28
CHO_3	1,21	0,60	C_4H_4O	4,43	0,28	$C_4H_{10}N$	4,86	0,09
CH_3NO_2	1,59	0,41	C_4H_6N	4,80	0,09	C_5H_{12}	5,60	0,13
CH_5N_2O	1,96	0,21	C_5H_8	5,53	0,12	**73**		
CH_7N_3	2,34	0,02	**69**			CHN_2O_2	1,94	0,41
$C_2H_5O_2$	2,32	0,42	CHN_4	2,62	0,03	CH_3N_3O	2,31	0,22
C_2H_7NO	2,69	0,22	C_2HN_2O	2,98	0,23	CH_5N_4	2,69	0,03
C_3H_9O	3,43	0,24	$C_3H_3N_3$	3,35	0,04	C_2HO_3	2,30	0,62
C_5H	5,42	0,12	C_3HO_2	3,34	0,44	$C_2H_3NO_2$	2,67	0,42
62			C_3H_3NO	3,71	0,25	$C_2H_5N_2O$	3,04	0,23
CH_2O_3	1,23	0,60	$C_3H_5N_2$	4,09	0,06	$C_2H_7N_3$	3,42	0,04
CH_4NO_2	1,60	0,41	C_4H_5O	4,44	0,28	$C_3H_5O_2$	3,40	0,44
CH_6N_2O	1,98	0,21	C_4H_7N	4,82	0,09	C_3H_7NO	3,77	0,25
CH_8N_3	2,35	0,02	C_5H_9	5,55	0,12	$C_3H_9N_2$	4,15	0,07
$C_2H_6O_2$	2,34	0,42	**70**			C_4H_9O	4,51	0,28
C_5H_2	5,42	0,12	CH_2N_4	2,64	0,03	$C_4H_{11}N$	4,88	0,10
63			C_2NO_2	2,62	0,42	C_6H	6,50	0,18

IV. REGULI GENERALE DE FRAGMENTARE IN SPECTROMETRIA DE MASA

IV. 1. Introducere

IV.2. Reactii de fragmentare

IV.2.1. Fragmentari simple

IV.2.2. Fragmentari insotite de transpozitia unui atom de hidrogen

IV.2.3. Fragmentari complexe

IV.2.4. Fragmentari insotite de transpozitia a doi atomi de hidrogen

IV.2.5. Fragmentari insotite de transpozitii de schelet

IV.2.6. Ioni importanti rezultati in urma reactiilor de fragmentare

IV. REGULI GENERALE DE FRAGMENTARE IN SPECTROMETRIA DE MASA

IV. I. Introducere

Ionii moleculari se pot fragmenta in diferite moduri, viteza fragmentarii fiind in functie de structura acestora, si de taria legaturilor prezente, acestea nescindandu-se cu aceeasi usurinta.

Fie E energia de ionizare si E +ΔE energia de fragmentare:

- daca E +ΔE >> E , ionul molecular este stabil si furnizeaza un semnal important in spectrul de masa.
- daca E +ΔE ~ E, ionul molecular odata format se va scinda foarte repede, furnizand diferite fragmente.

Prima alternativa o intalnim in cazul compusilor care se pot stabiliza prin delocalizarea sarcinii pozitive, iar cea de-a doua, in cazul compusilor la care sarcina pozitiva este greu de stabilizat.

Numarul si abundentele diferitelor fragmente ionice ce apar in spectrul de masa depind de:

- instabilitatile relative ale legaturilor din ionul molecular (taria relativa)
- stabilitatile relative ale fragmentelor ionice ce se formeaza
- stabilitatea unor fragmente neutre care se elimina din ioni
- probabilitatea tranzitiilor care decurg printr-un proces ciclic de rearanjare, implicand deplasari de legaturi si transferuri de atomi de hidrogen
- probabilitatea formarii ionilor de coliziune

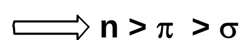
Exista o asemanare intre procesele care se produc in spectrometrul de masa si descompunerea termica a compusilor organici.

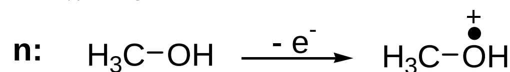
Cateva reguli generale care permit sa se intrevada modul in care se vor fragmenta compusii organici au fost enuntate tinand cont de efectele inductive, electromere, de polarizabilitate cunoscute din chimia organica.

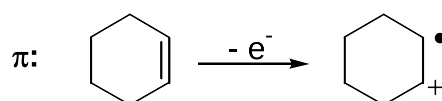
Se va nota cu -deplasarea unui singur electron

-deplasarea a doi electroni

1. Intensitatea relativa a semnalului furnizat de ionul molecular este maxima la compusii liniari si scade proportional cu cresterea gradului de ramificare, fragmentarile producandu-se mai usor si preferential la atomii de carbon cei mai substituiti. Aceasta este in concordanta cu seria stabilitatii carbocationilor: Cp < Cs < Ct;
2. Dintre mai multi substituenti legati de acelasi atom de carbon, se fragmenteaza preponderent cel cu masa mai mare;
3. Intr-o serie omoloaga, intensitatea relativa a semnalului ionului molecular scade odata cu cresterea masei moleculare. Probabilitatea de a avea loc o fragmentare creste odata cu cresterea numarului de legaturi;
4. Legaturile multiple, ciclurile aromatice, cele heteroaromatice, chiar si heteroatomii, stabilizeaza ionii moleculari, facand ca acestia sa aiba intensitati mai mari. Aceasta se explica prin aceea ca este mai usor de smuls un electron π sau *p*, decat unul σ, iar sarcina se localizeaza mai puternic in prezenta electronilor π sau *p*;







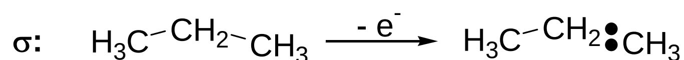
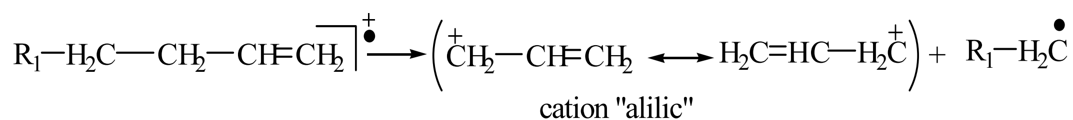
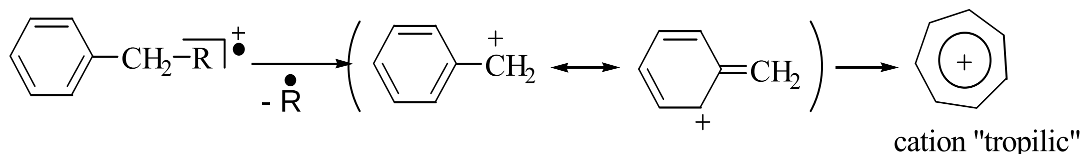


Figura 4.1. Exemplificari ale locului unde are loc initial ionizarea

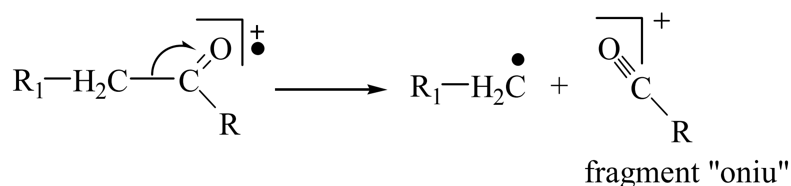
5. Dublele legaturi, chiar si triplele legaturi favorizeaza fragmentari ce conduc la cationi de tip alilic stabilizati prin conjugare:



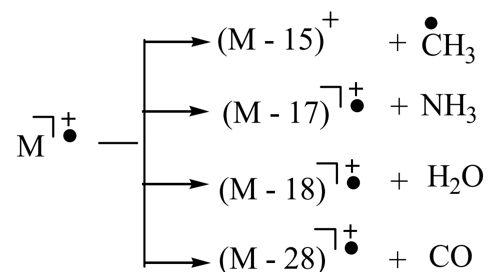
6. Ciclurile benzenice si in general cele aromatice favorizeaza fragmentari care conduc la cationi de tip tropilic:



7. Combinatiile ce contin heteroatomi se fragmenteaza preferential in pozitia α fata de legatura C=X, furnizand ioni stabilizati prin conjugare, de tip “oniu”, exemplu la cetone:



8. Reactiile de fragmentare sunt adesea insotite de eliminarea unor molecule neutre cu masa moleculara mica, cum ar fi oxid si dioxid de carbon, olefine, acetilena, H_2O, NH_3, SH_2, HCN, mercaptani, $CH_2=O$, alcooli. Aceste molecule sunt recunoscute in mod indirect prin prezenta fragmentelor ionice care se obtin din ionul molecular, avind valori caracteristice:



IV.2. REACTII DE FRAGMENTARE

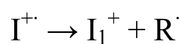
Marea diversitate a reactiilor de fragmentare a ionilor pozitivi, consecinta directa a diversitatii structurale si functionale a compusilor organici, creaza dificultati majore in clasificarea lor. Cea mai intalnita clasificare a reactiilor de fragmentare este urmatoarea:

1. fragmentari simple;
2. fragmentari insotite de transpozitia unui atom de hidrogen;
3. fragmentari complexe;
4. fragmentari insotite de transpozitia a doi atomi de hidrogen;
5. fragmentari insotite de transpozitii de schelet.

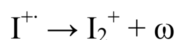
IV.2. 1. Fragmentari simple

In general, procesul fragmentarii simple implica ruperea unei legaturi, formandu-se ioni si radicali sau ioni si molecule neutre.

In maniera cea mai generala, acest proces arata astfel:



$I^{+\cdot} \rightarrow I_1^{+} + R^{\cdot}$



$I^{+\cdot} \rightarrow I_2^{+} + \omega$

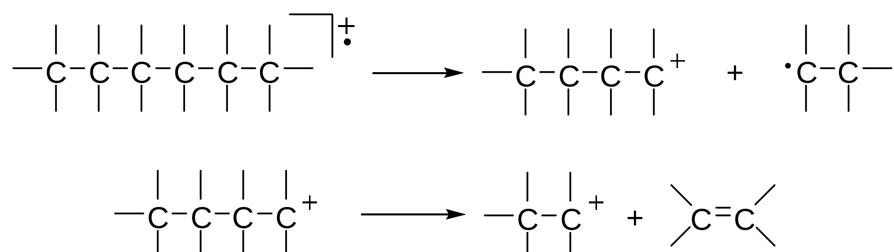
Din categoria fragmentarilor simple fac parte mai multe tipuri de fragmentari:

- fragmentarea alchilica;
- fragmentarea legaturii carbon-heteroatom;
- fragmentarea in α fata de legatura carbon-heteroatom C-X sau C=Y (fragmentarea de tip "oniu");
- fragmentarea in β fata de dubla legatura C=C (fragmentarea alilica);
- fragmentarea in β fata de un sistem aromatic. Fragmentarea tropilica.

1. Fragmentarea alchilica

Caracteristicile principale ale acestei fragmentari sunt:

- ionul molecular sau un fragment ionic se scindeaza furnizand carbocationi alchilici;
- se intalneste la toti compusii organici care contin in molecula lor un numar de atomi de carbon ≥ 2;
- schema reactiei de fragmentare este:



- in cazul normal alcanilor:
    - fragmentele alchilice de formula generala $C_nH_{2n+1}^+$ vor furniza semnale la masele: 29 (etil), 43 (propil), 57 (butil), 71 (pentil), 85 (hexil),etc. (picuri despartite de 14 unitati);
    - ionul molecular scade in intensitate odata cu cresterea mase moleculare, dar este inca detectabil la C_{40};
    - in fig. IV.4.2 este prezentat spectrul de masa al *n*-tetradecanului, M= 198.

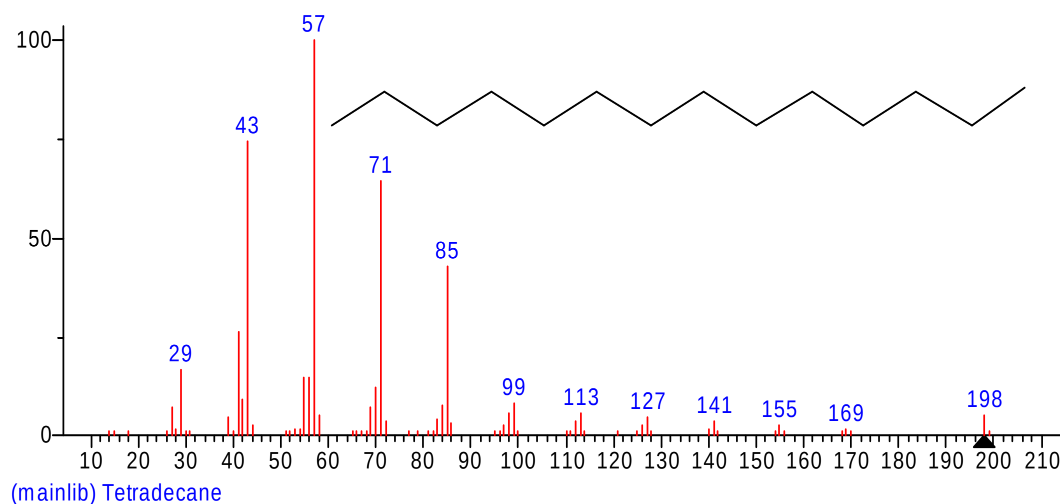


Figura IV.4.2. Spectrul de masa al *n*-tetradecanului

Se observa ionul molecular (m/z= 198, intensitate 7%), fragmentele principale (57, 43, 71, 85, 29, 99) sunt picuri despartite de 14 Daltoni, iar picul de baza este un fragment n-butilic (m/z= 57, 100%); schema reactiei de fragmentare este prezentata in fig. IV.4.3.a.;

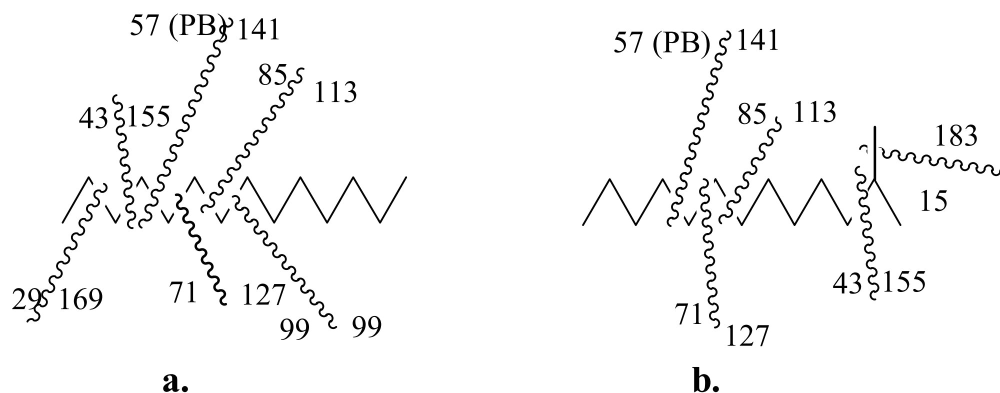


Figura IV.4.3. Schema reactiei de fragmentare al *n*-tetradecanului (***a***) si 7-metil-tridecanului (***b***)

- in cazul alcanilor ramificati:

- au tendinta de fragmentare la nivelul ramificatiei;
- o pierdere de masa de 15 unitati (M-15) indica un metil (CH_3) ramificat;
- ionul molecular scade in intensitate odata cu cresterea ramificarii si poate sa nu apara in spectru;
- in fig. IV.4.4 este prezentat spectrul de masa al 2-metil-tridecanului, M= 198.

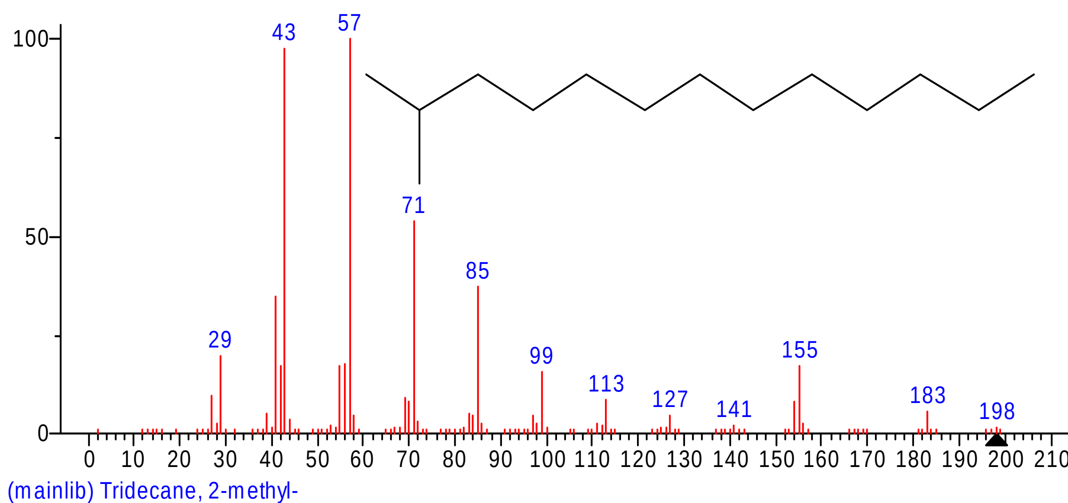
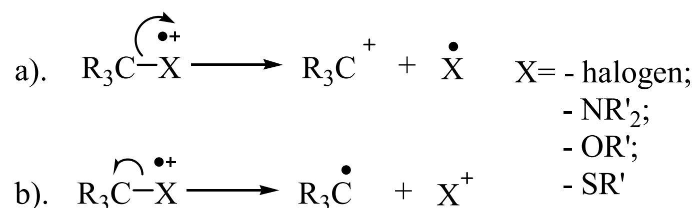


Figura IV.4.4. Spectrul de masa al 2-metil-tridecanului

Ionul molecular abia se observa (m/z= 198, 1%), apare M-15 (m/z= 183, 3%), pozitia ramificatiei este indicata de fragmentele de la m/z 155 (17%) si 43 (98%) (intensitatea picurilor este mult mai mare ca la compusul neramificat); fragmentele principale (29, 57, 71, 85, 99) sunt picuri despartite de 14 Daltoni, iar picul de baza este un fragment butilic (m/z= 57, 100%); schema reactiei de fragmentare este prezentata in fig. IV.4.3.b.

2. Fragmentarea legaturii carbon-heteroatom

In cazul acestui tip de fragmentare, sunt posibile si cunoscute doua moduri uzuale de scindare:



Din cauza si in masura electronegativitatii heteroatomilor, tipul de fragmentare a) este preponderent.

Fragmentarea dupa schema a) mai este favorizata si de efectele +*I* ale resturilor R, precum si de apartenenta carbonului adiacent heteroatomului la un sistem capabil sa stabilizeze sarcina pozitiva (de exemplu sistemul aromatic). Exemple: 2-clorobutanul (spectrul de masa este prezentat in fig IV.4.5), si etilizobutiltioeterul.

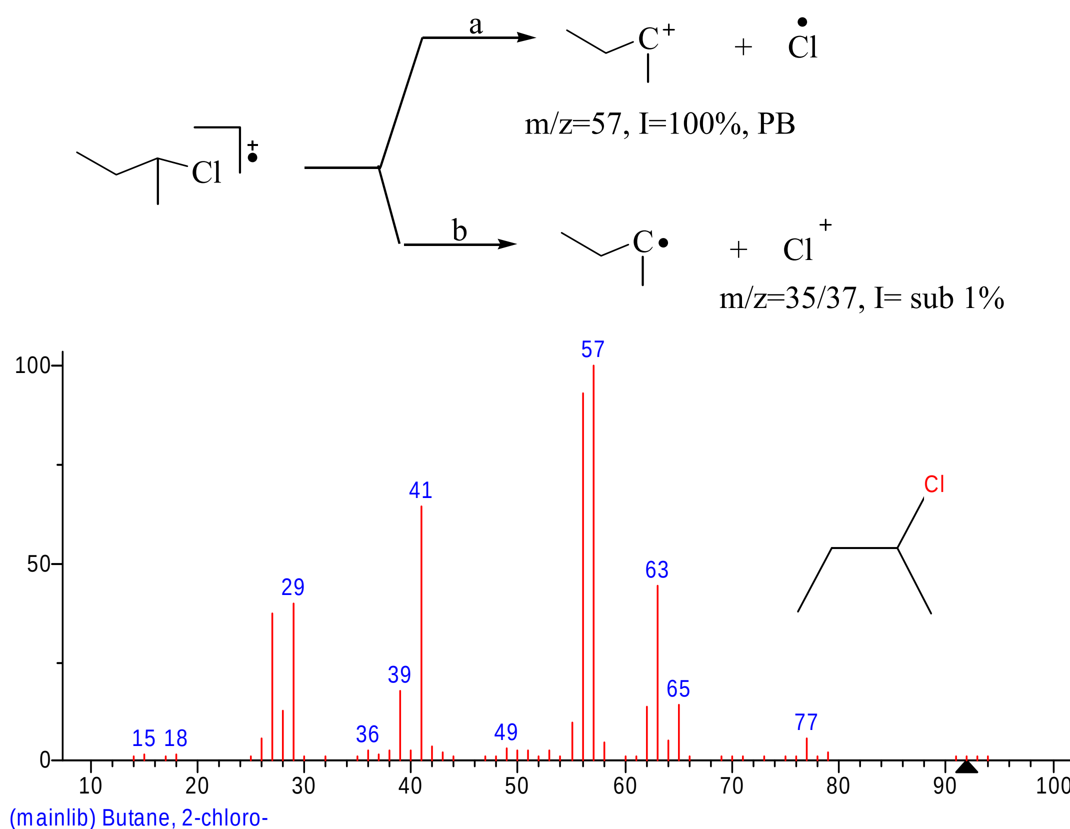
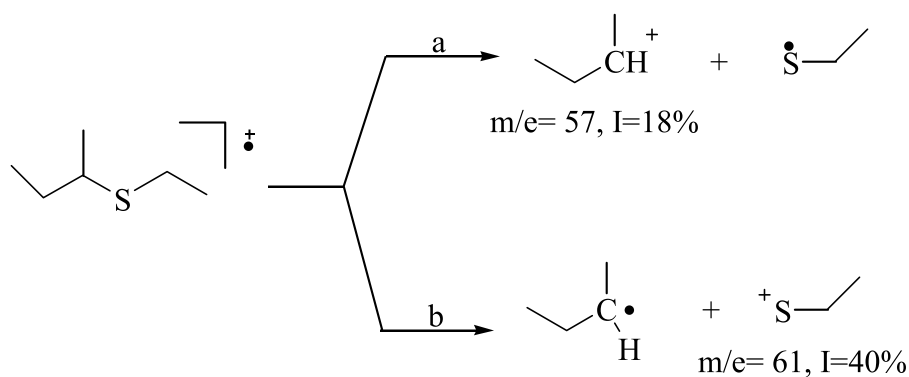


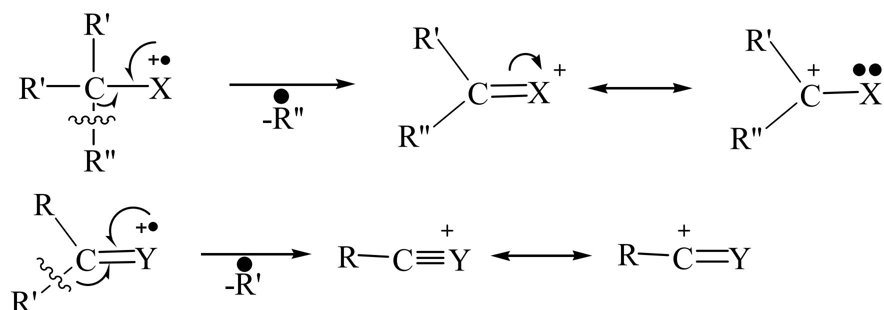
Figura IV.4.5. *Spectrul de masa al 2-clorobutan*



Comparativ cu derivatii clorurati, cei iodurati si tioeterii, datorita stabilizarii sarcinii pozitive de catre iod sau sulf se scindeaza mai abundent dupa schema b).

3. Fragmentarea in α fata de legatura carbon-heteroatom C-X sau C=Y (fragmentarea de tip "oniu")

In afara de scindarea legaturii C-X, compusii care contin heteroatomi se fragmenteaza usor in pozitia α fata de aceasta legatura. Procesul decurge conform schemelor:

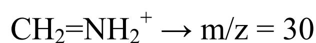


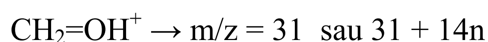
unde X= halogen, NH_2, NHR, NR_2, OH, OR, SH, SR

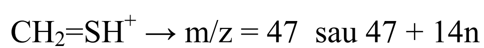
Y= O, S, NH, NR

Aceasta scindare fiind de obicei preponderenta, furnizeaza in majoritatea cazurilor picurile de baza.

Ionii rezultati prin fragmentari in α furnizeaza picuri la masele minime:

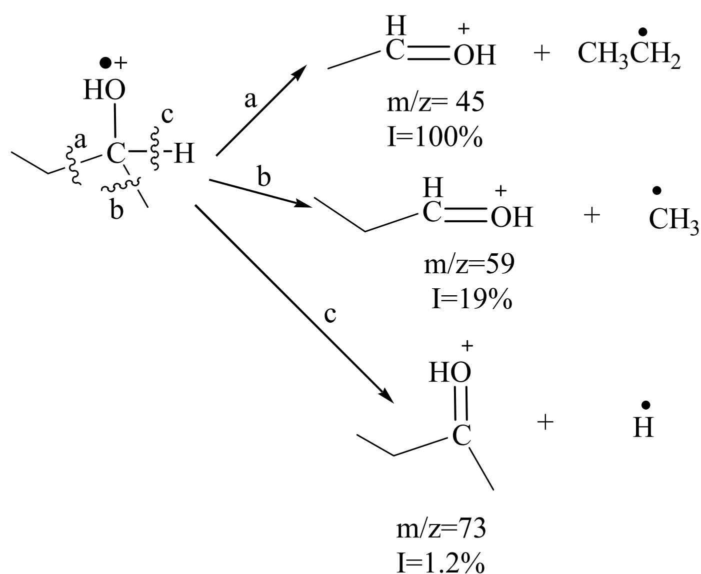

$CH_2{=}NH_2^+ \rightarrow m/z = 30$


$CH_2{=}OH^+ \rightarrow m/z = 31$ sau 31 + 14n


$CH_2{=}SH^+ \rightarrow m/z = 47$ sau 47 + 14n


$CH_2{=}X^+ \rightarrow m/z = M_{halogen} + 14$ sau $M_{halogen} + 14n$

Dintre radicalii alchil, cel mai mare se va scinda mai usor. De exemplu, fragmentarea in α a alcoolului butilic secundar (spectrul de masa este prezentat in fig IV.4.6),:



Abundentele mai mici ale ionilor proveniti din fragmentarile (b) si (c), se datoresc instabilitatii mari a radicalilor $CH_3^{\cdot}$ si $H^{\cdot}$, ceea ce face ca stabilitatea ionilor sa fie in acest caz invers proportionala cu abundenta lor.

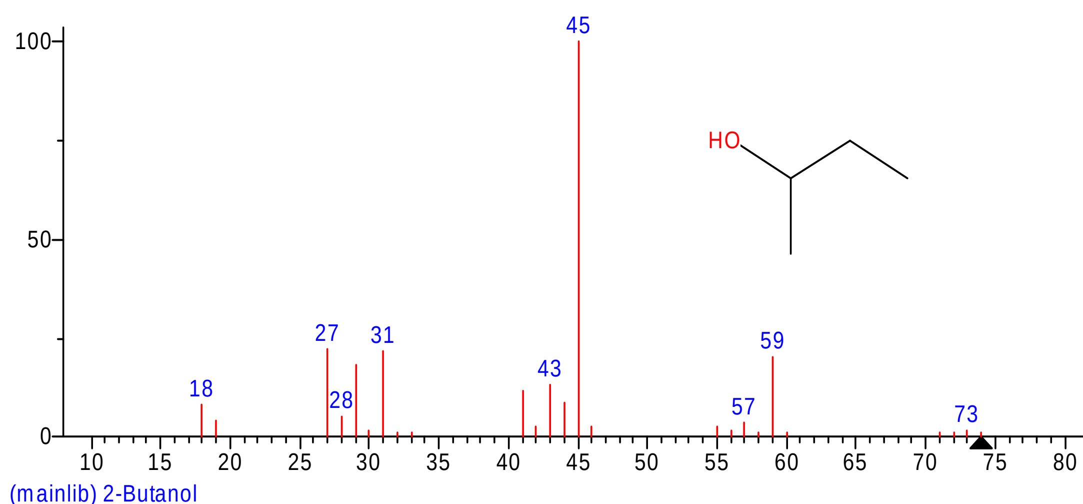


Figura IV.4.6. *Spectrul de masa al 2-butanol*

Prin inregistrarea spectrelor de masa la compusi cu structuri de tipul X-CH_2CH_2-Z, X si Z fiind heteroatomi, s-a gasit urmatoarea ordine a stabilitatii:

$CH_2{=}NH_2^+ > CH_2{=}SH^+ > CH_2{=}OH^+ > CH_2{=}F^+$

De exemplu, pentru etanolamina (spectrul de masa este prezentat in fig IV.4.7), s-a obtinut:

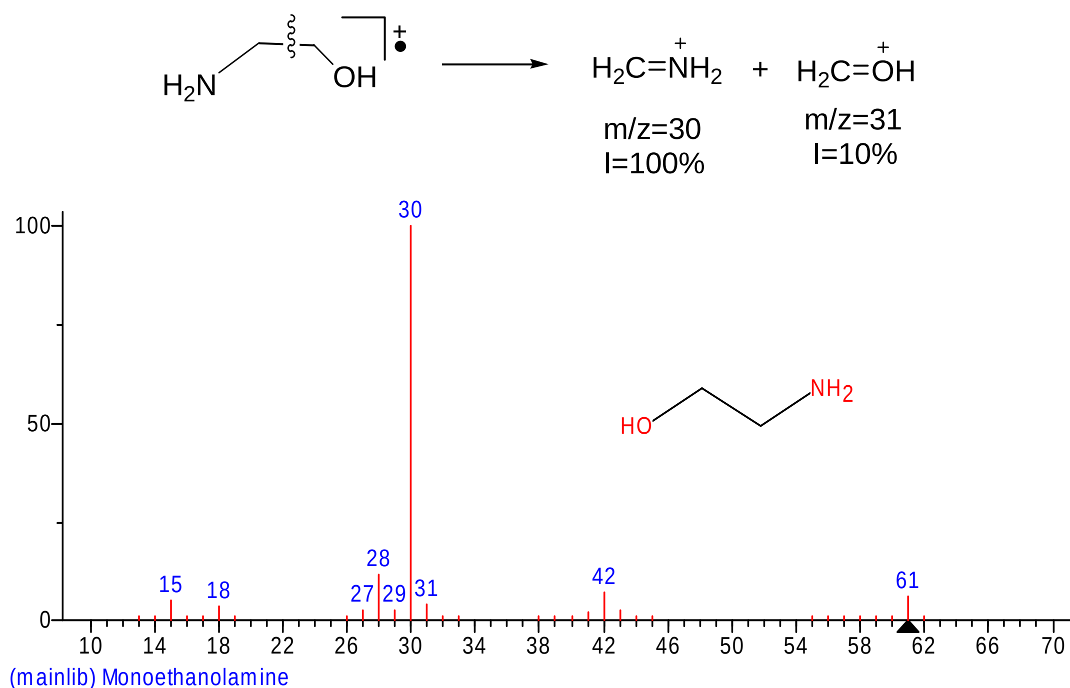
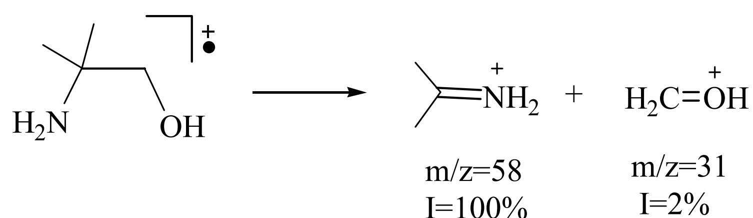


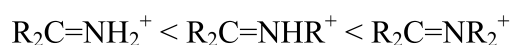
Figura IV.4.7. *Spectrul de masa al etanolaminei*

Prin inlocuirea atomilor de hidrogen cu diversi radicali, stabilitatile relative si deci, abundentele acestor ioni pot fi mult modificate. Sensul acestor modificari va depinde de efectele inductive si electromere ale radicalilor. De exemplu, in cazul 1-hidroxi-2-amino-2-metilpropanului s-au obtinut urmatoarele abundente:



Prin efectul lor *+I*, gruparile alchil maresc stabilitatea fragmentelor incarcate pozitiv in care se gasesc. Deoarece aceleasi grupari sunt raspunzatoare si de cresterea bazicitatii heteroatomilor de care sunt legate, s-au putut studia comparativ bazicitatile aminelor “pure” (in absenta influentei solventilor si a

factorilor sterici) prin intermediul abundentelor relative ale fragmentelor rezultate prin scindari in α. S-a gasit ca abundentele ionilor cresc in ordinea:



$$R_2C{=}NH_2^+ < R_2C{=}NHR^+ < R_2C{=}NR_2^+$$

Prin urmare si bazicitatea reala a aminelor creste in ordinea: amine primare < amine secundare < amine tertiare.

Acolo unde se este cazul, exista o concurenta intre scindarile in α si scindarea legaturii C-X, aceasta poate fi determinata din abundentele picurilor furnizate. De exemplu, daca consideram cazul 2-cloro-2-metilbutanului (spectrul de masa este prezentat in fig IV.4.8), se observa ca fragmentarea in α este preponderenta (intensitate 100%):

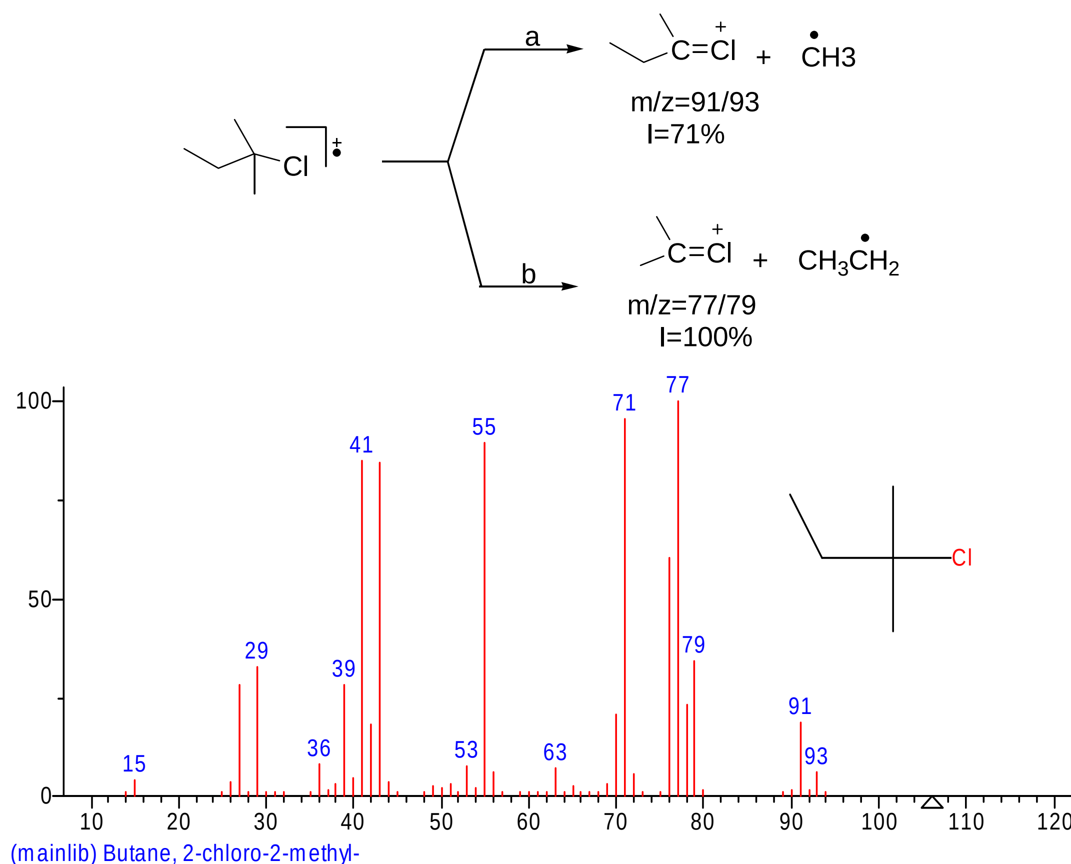


Figura IV.4.8. *Spectrul de masa al 2cloro-2-metil-butan*

Fragmentarile „oniu" ale compusilor de tip R(R')C=Y se intalnesc la aldehide, cetone, amide, esteri, cloruri acide, chinone, tioesteri, etc. In functie, in

primul rand, de stabilitatile fragmentelor care se formeaza, se fragmenteaza preponderent unul din cei doi radicali. De exemplu, fragmentarea „oniu' a esterului metilic al acidului n-butanoic si a aldehidei propionice decurg dupa schemele de mai jos (spectrele de masa sunt prezentate in fig IV.4.9 si IV.4.10).

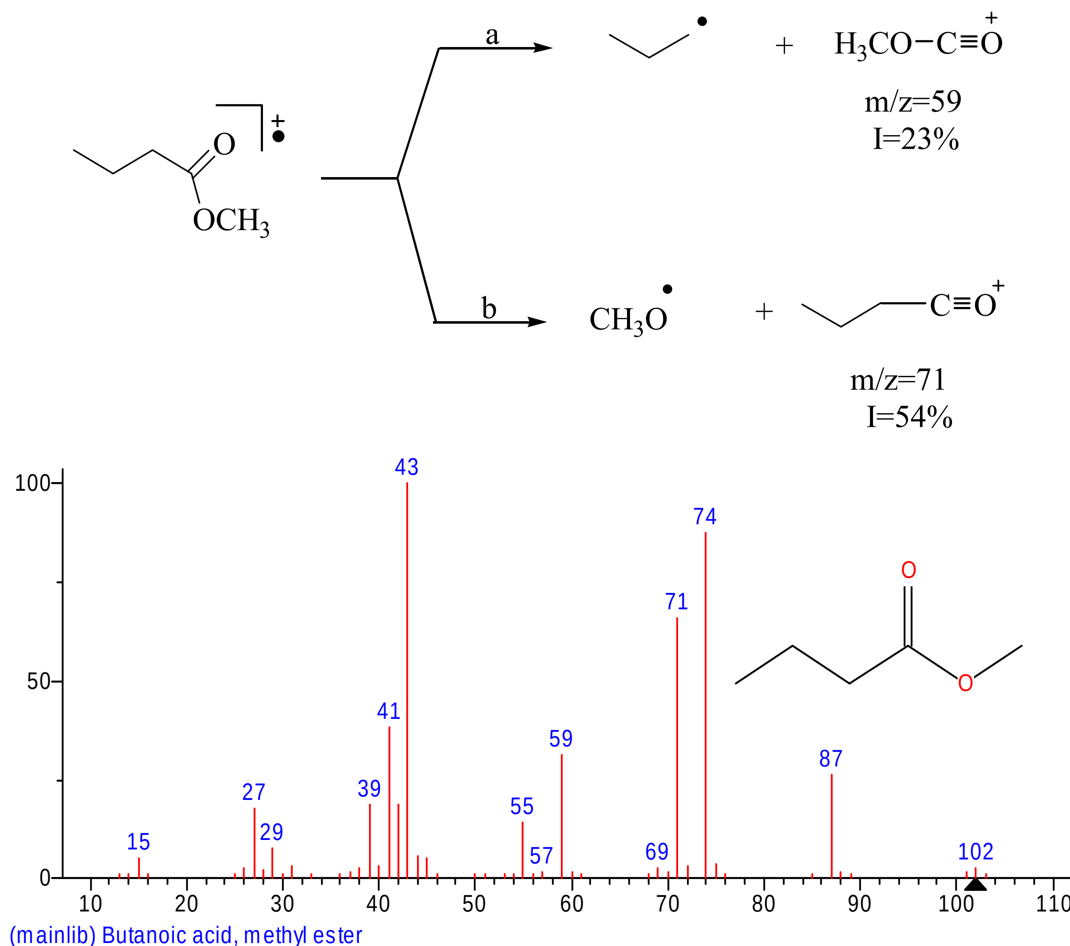


Figura IV.4.9. *Spectrul de masa al esterului metilic al acidului n-butanoic*

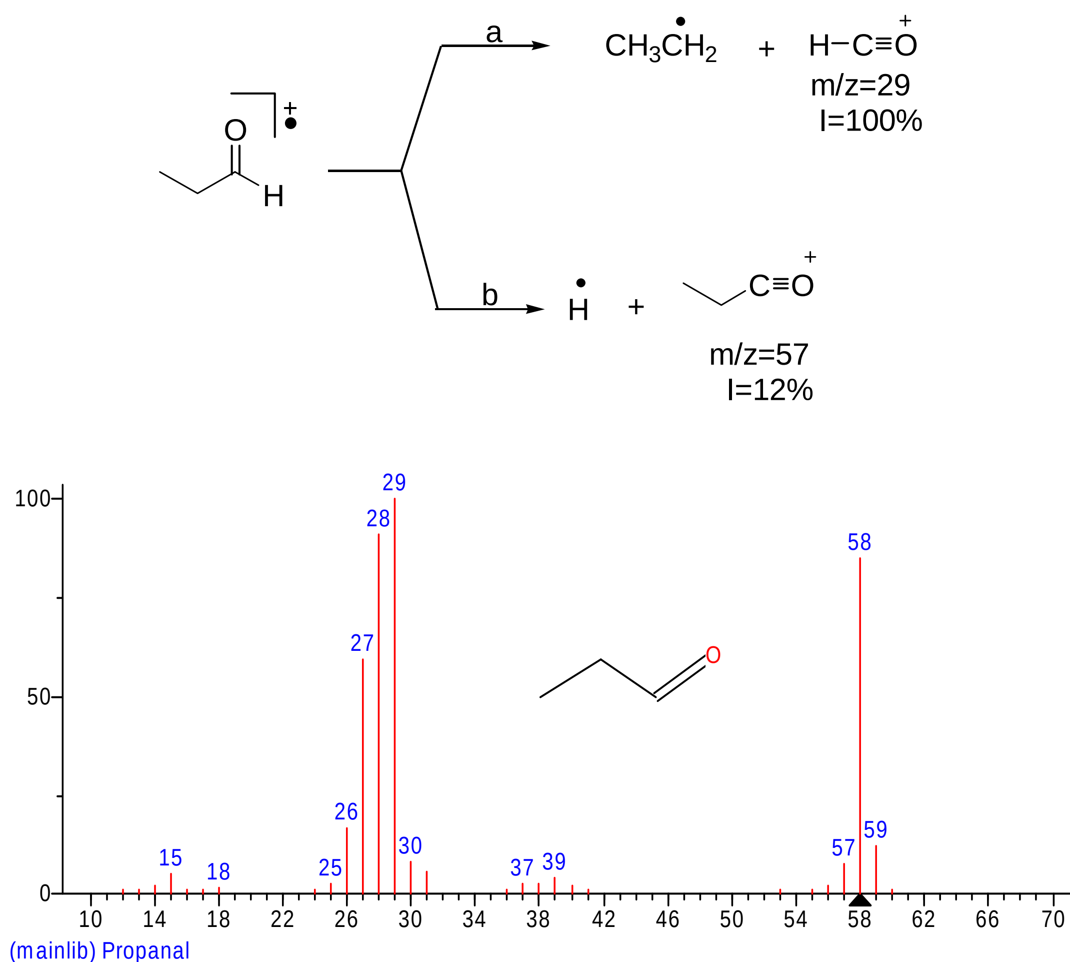


Figura IV.4.10. *Spectrul de masa al aldehidei propionice*

Prin inlocuirea oxigenului aldehidic cu ^{18}O s-a stabilit ca semnalul de la m/z=29 este dat de fragmentul $HC\equiv O^+$ si nu de $CH_3CH_2^+$.

4. Fragmentarea in β fata de dubla legatura C=C (fragmentarea alilica)

Prezenta unei duble legaturi in ionul molecular, favorizeaza scindarea legaturii simple din pozitia β. Exemplu, cazul izopentenei (fig. IV.4.11), se observa ca picul de baza (m/z= 55, 100%) rezulta prin fragmentare in pozitia β a unui radical metil:

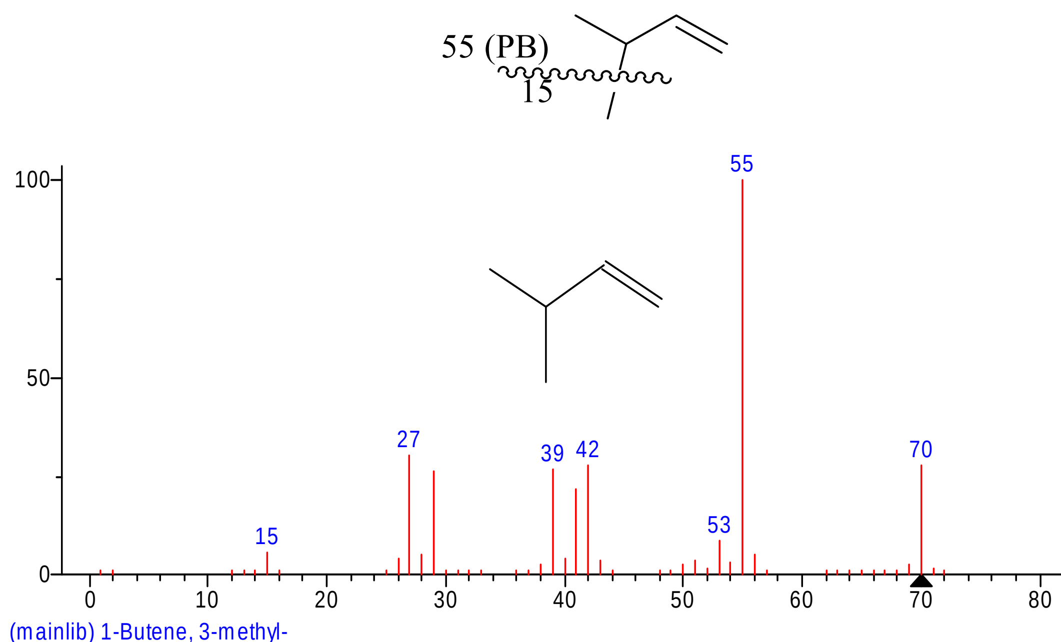
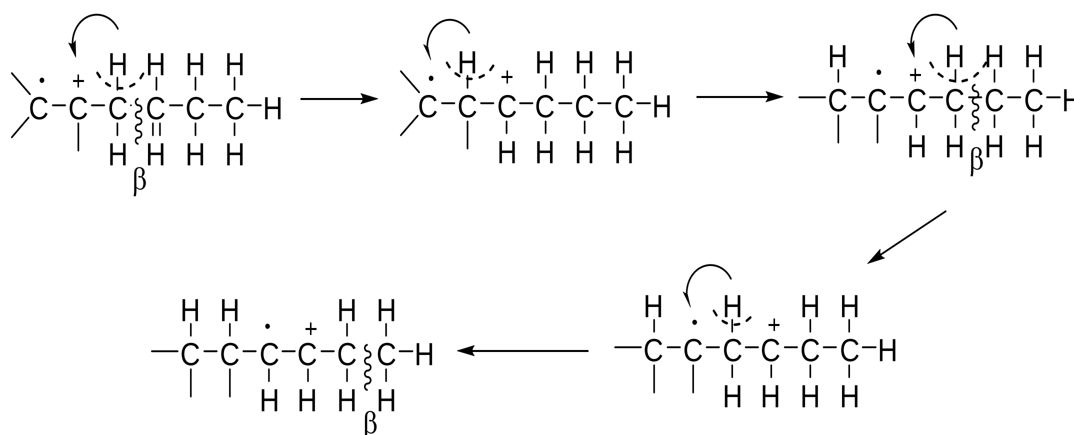
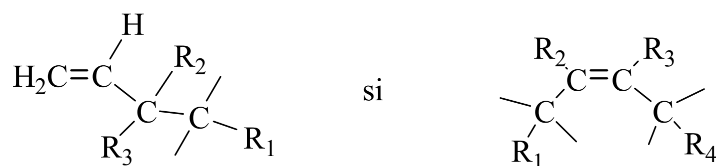


Figura IV.4.11. *Spectrul de masa al izopentenei*

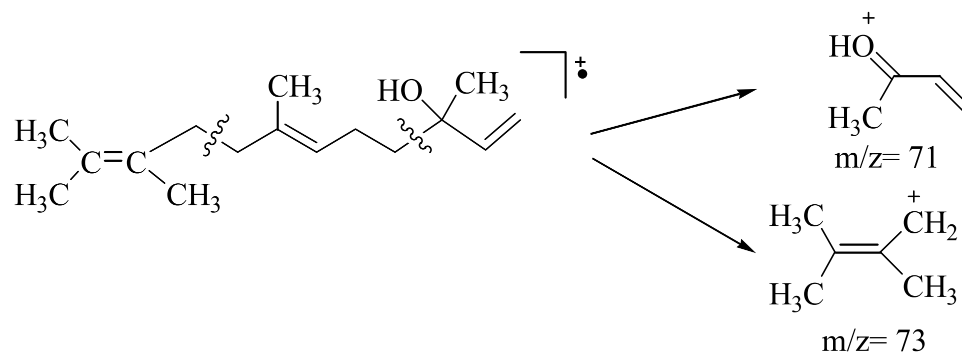
Totusi nu se poate stabili pozitia dublei legaturi intr-un lant hidrocarbonat deschis, decat in anumite cazuri. Se constata ca oricare dintre legaturile C-C din molecula se poate scinda aproximativ cu aceeasi probabilitate. Fenomenul poate fi explicat daca se admite ca timpul necesar producerii scindarii este mai mare decat cel de migrare succesiva a unor ioni hidrura si atomi de hidrogen.



Intr-adevar substituirea hidrogenilor din pozitia alilica cu resturi alchil, blocheaza migrarile amintite permitand localizarea dublei legaturi. Acelasi lucru este valabil si pentru olefinele cu carboni dublu legati complet substituiti.



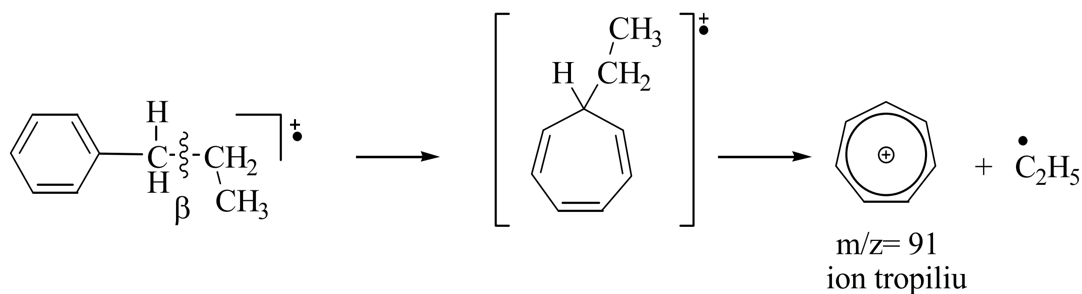
S-a gasit de exemplu ca ionul molecular de mai jos furnizeaza semnale foarte intense la masele 71 si 73.



Evident formarea ionului cu masa 71 este facilitata si de structura "oniu" a lui.

5. Fragmentarea in β fata de un sistem aromatic. Fragmentarea tropilica.

Ciclurile aromatice substituite cu cel putin un rest alchil sau care fac parte dintr-un sistem ciclic, favorizeaza fragmentarea legaturii C-C din pozitia β fata de ciclul aromatic. Prin marcare cu ^{13}C si D s-a dovedit ca in locul ionului benzil se formeaza de fapt ionul tropiliu (m/z= 91). Exemplu: fragmentarea tropilica a n-propilbenzenului (din fig. IV.4.12 se observa ca ionul tropiliu este chiar pic de baza).



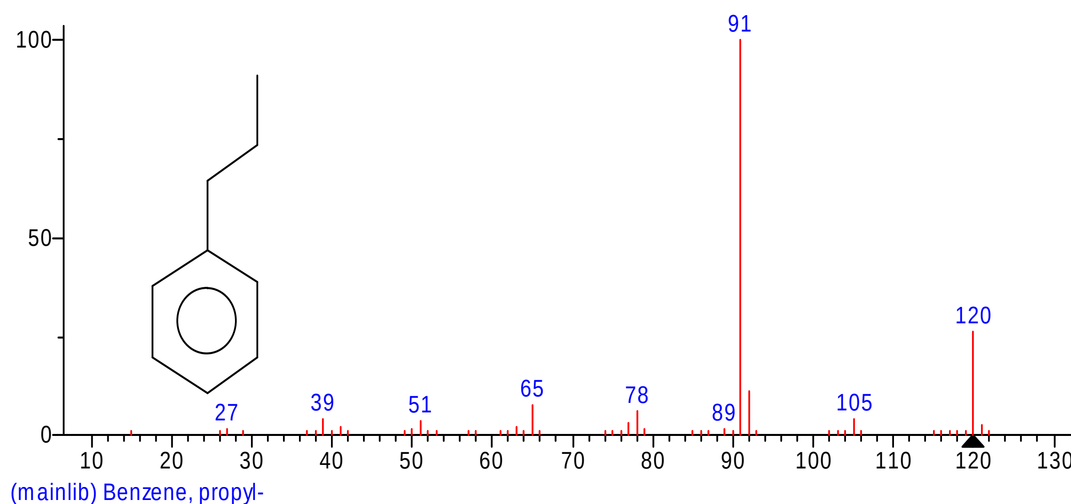
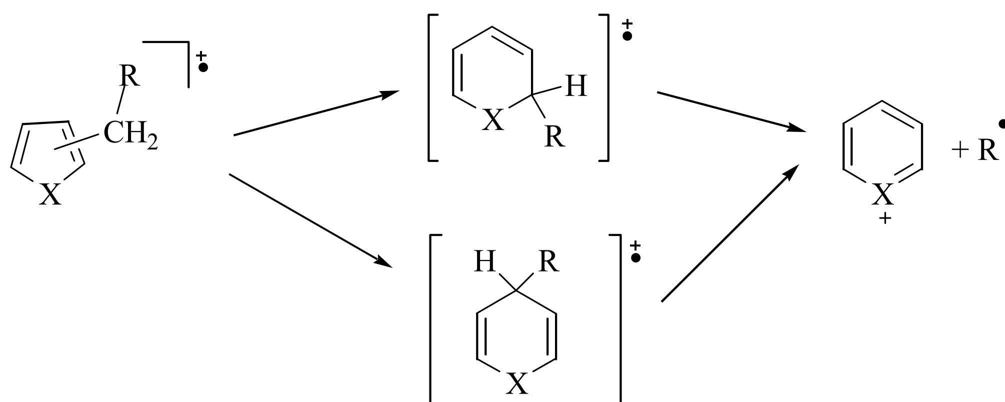
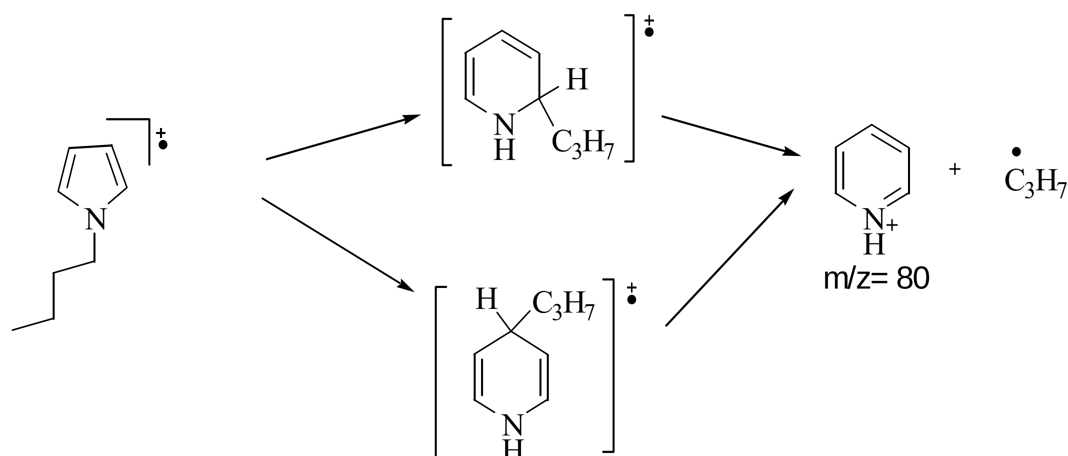


Figura IV.4.12. *Spectrul de masa al n-propilbenzenului*

Transpozitii similare se produc si la sistemele heteroaromatice cu 5 si 6 atomi in ciclu. Heterociclii cu 6 atomi cum ar fi alchil-piridinele conduc la ioni de azotropiliu, iar cu cei 5 atomi isi largesc ciclul, conform schemei de fragmentare de mai jos:



Exemplu: 1-butil-1H-pirol (spectrul de masa este prezentat in fig IV.4.13); se observa ca fragmentele de la 80 (76%) si 81 (100%, PB) se pot explica tocmai prin largirea de ciclu.



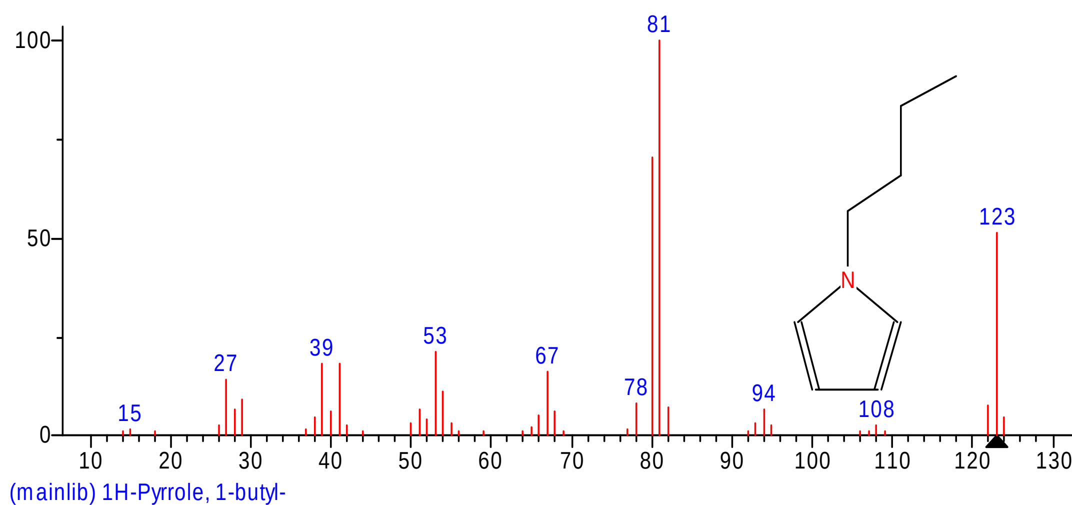
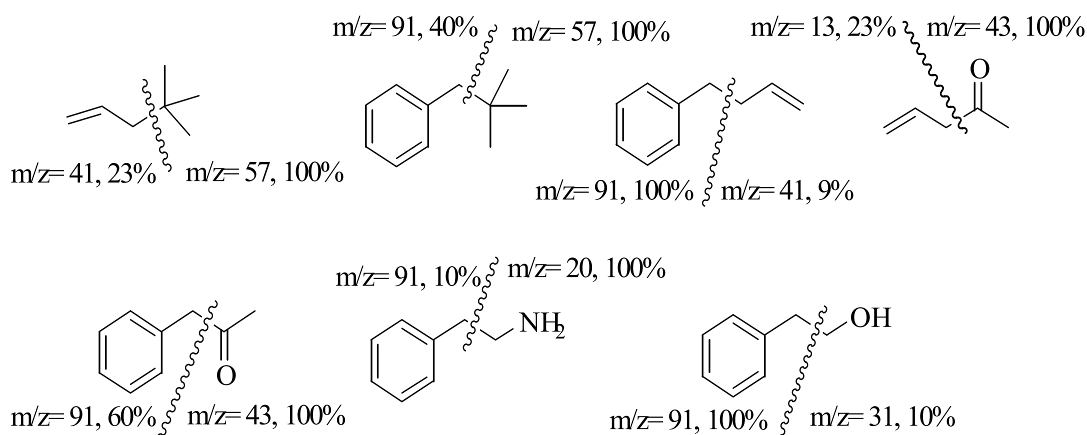
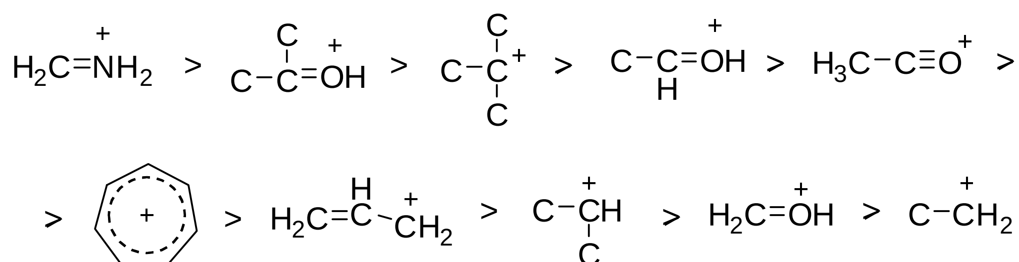


Figura IV.4.13. *Spectrul de masa al 1-butil-1H-pirol*

Indiferent de pozitia substituientului se obtine acelasi ion, tropiliu. Fragmentarile tropilice sunt adesea preponderente furnizand picurile de baza. Studiul intensitatii stabilizarii sarcinii pozitive de diferite fragmente rezultate in urma scindarilor alilice si tropice au condus la urmatoarele rezultate:



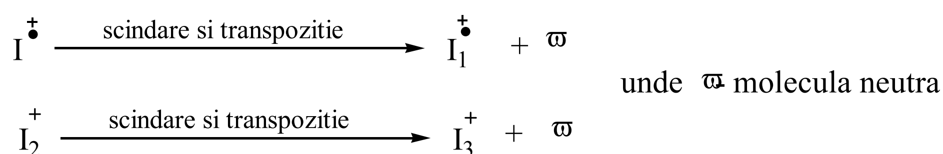
In consecinta, se poate aprecia ca ordinea descrescatoare a stabilizarii sarcinii pozitive de catre diferiti ioni furnizati la fragmentarile simple poate fi redata prin seria:



IV.2.2. Fragmentari insotite de transpozitia unui atom de hidrogen

O serie de picuri care apar in spectrele de masa a unui numar mare de compusi organici, nu pot fi explicate decat admitand transpozitia unui atom de hidrogen. Ionii rezultati in urma transpozitiei unui hidrogen in cursul scindarii unei legaturi se numesc ”ioni de transpozitie”.

In modul cel mai general aceasta transpozitie poate fi redata prin ecuatiile:



Posibilitatea producerii acestui proces este conditionata de urmatoarele aspecte:

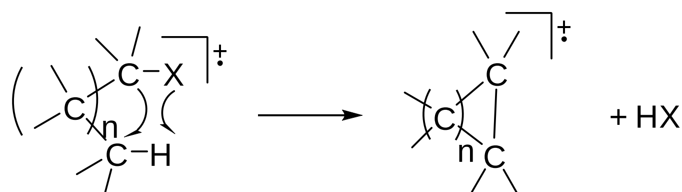
a. Stereochimia ionului: transpozitia se produce intre centre apropiate spatial, printr-o stare de tranzitie ciclica care implica trecerea unei bariere energetice mici;
b. Molecula si ionul format sau ce putin unul dintre ei trebuie sa fie deosebit de stabil.

In functie de rezultatul final sau de mecanism, aceste fragmentari se pot clasifica dupa cum urmeaza:

- transpozitia unui proton insotita de eliminarea grupei functionale;
- transpozitia unui proton insotita de retroaditie 1,4;
- transpozitia Mc Lafferty;
- transpozitia hidrogenului in lanturi ionice de tip “oniu”;
- transpozitii ion-dipol.

1. Transpozitia unui proton insotita de eliminarea grupei functionale

Acest proces implica transpozitia unui hidrogen la grupa functionala in cursul fragmentarii acesteea:



unde X= -OH, -OR, $-NH_2$, -NHR, $-NR_2$, -X, -SH, RCOO-, RCONH- si –CN.

Abundenta fragmentelor ionice rezultate este proportionala cu electronegativitatea gruparii functionala. Astfel, daca pentru X= F, Cl, OH, picurile de la masele M^{+}-(X+1) sunt intense, pentru X= NH_2, NHR, NR_2, Br si I in multe cazuri lipsesc din spectru. Se observa ca aceste picuri au masele cu o unitate mai mica decat cele rezultate prin fragmentare simpla.

Prin marcari cu deuteriu s-a stabilit ca eliminarile se produc din pozitiile 1,2, 1,3, 1,4, etc, preponderente fiind cele din 1,3 si 1,4. De exemplu scindarea apei din n-butanol (spectrul de masa este prezentat in fig IV.4.14) conduce la ionul-radical de la m/z= 56, care este si pic de baza.

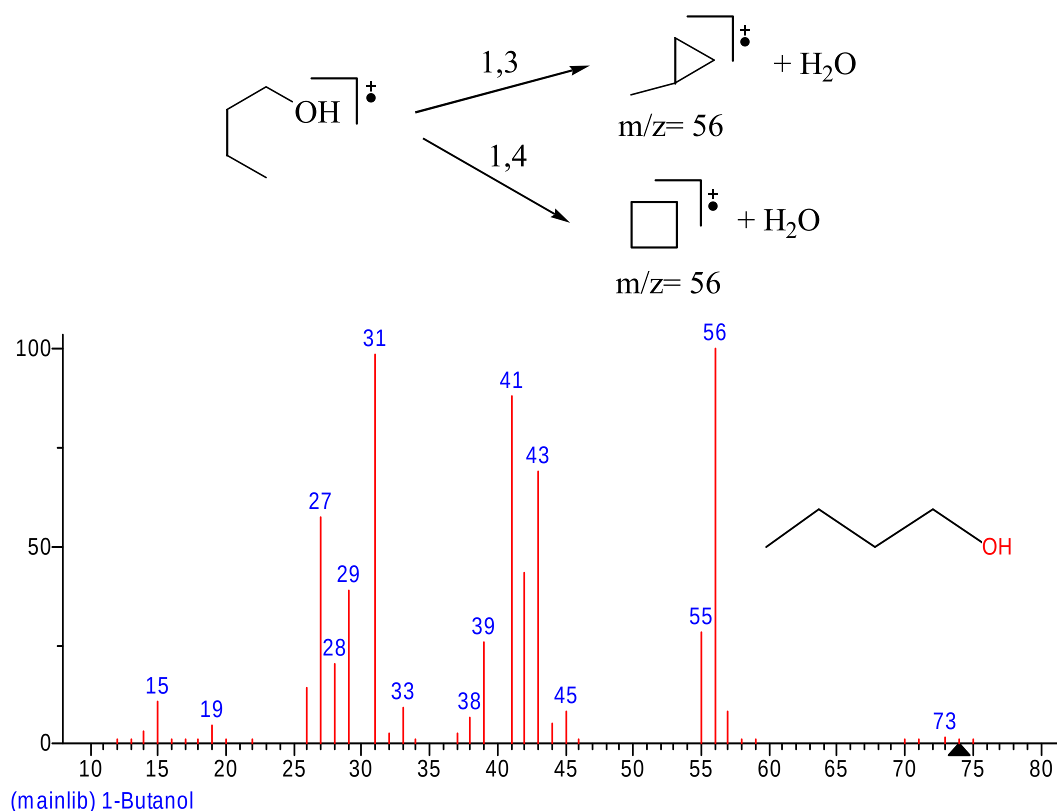
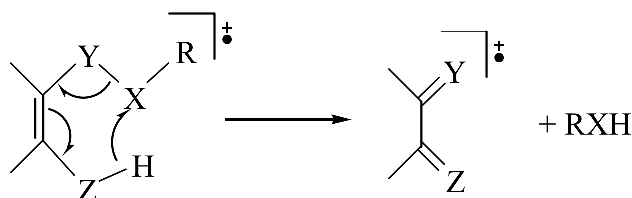


Figura IV.4.14. *Spectrul de masa al n-butanol*

2. Transpozitia unui proton insotita de retroaditie 1,4

Ionii moleculari sau de fragmentare ai olefinelor 1,2-*cis*-disubstituite si ai derivatilor aromatici *orto*-disubstituiti care contin cel putin un hidrogen pe unul din

substituienti, pot elimina o molecula neutra conform schemei:

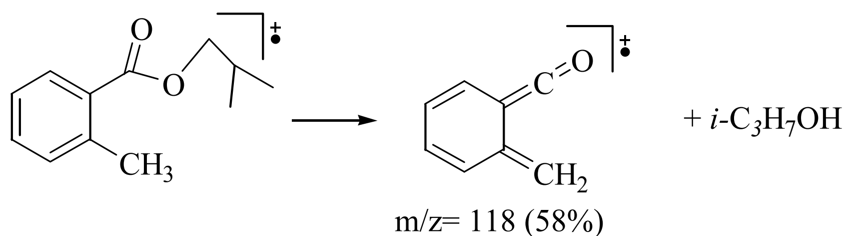


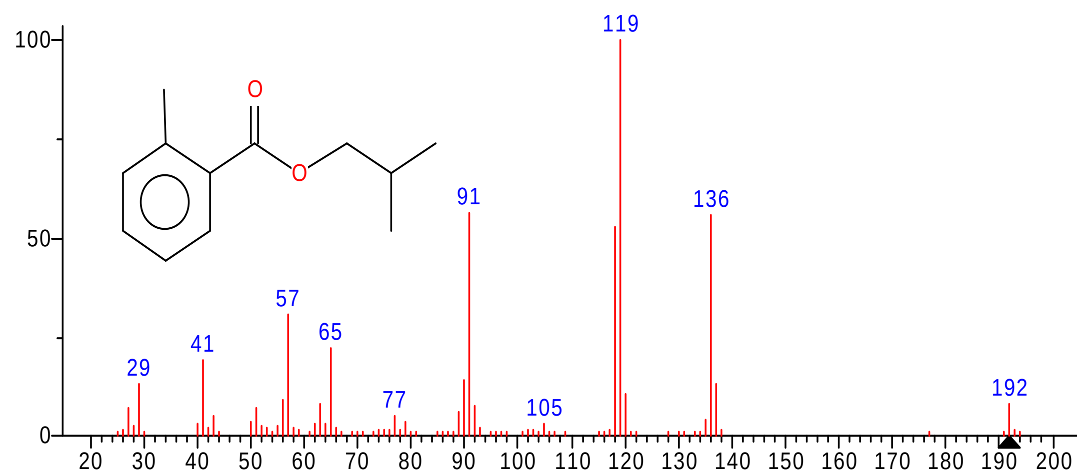
unde X, Y, Z pot fi C, N, O, S iar R = alchil, aril, acil.

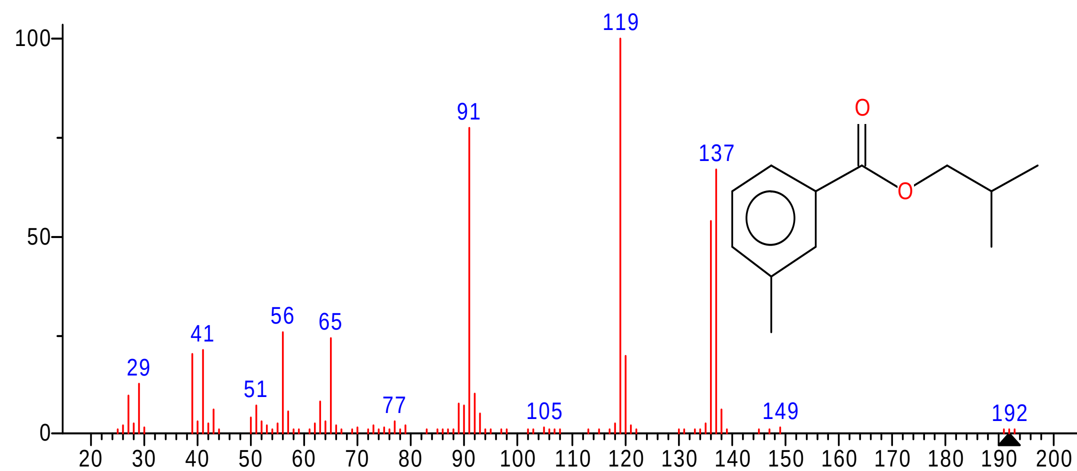
Aceasta fragmentare are urmatoarele caracteristici:

- decurge printr-o stare de tranzitie ciclica intre sase atomi incluzand si hidrogenul;
- hidrogenul se transpune intotdeauna de pe atomul 1 pe atomul 5 in timpul fragmentarii acestuia;
- rezulta ioni-radicali cu structura di-sau polienica, mai mici cu o unitate de masa decat ionii rezultati prin fragmentare simpla;
- permite distingerea izomerilor *orto de meta si para*, precum si a celor *cis de trans* in cazul olefinelor. *Numai izomerii orto si cis* pot da stari de tranzitie ciclica care furnizeaza eliminarea.

Astfel, daca consideram drept exemplu cazul esterilor metilici al acidului metil-benzoic, din analiza spctrelor de masa (fig. IV.4.15), se obsera ca intensitatea ionului de masa 118, care corespunde starii de tranzitie ciclica de sase atomi (schema de mai jos), este mare in cazul de esterului metilic al acidului o-metil benzoic (58%):







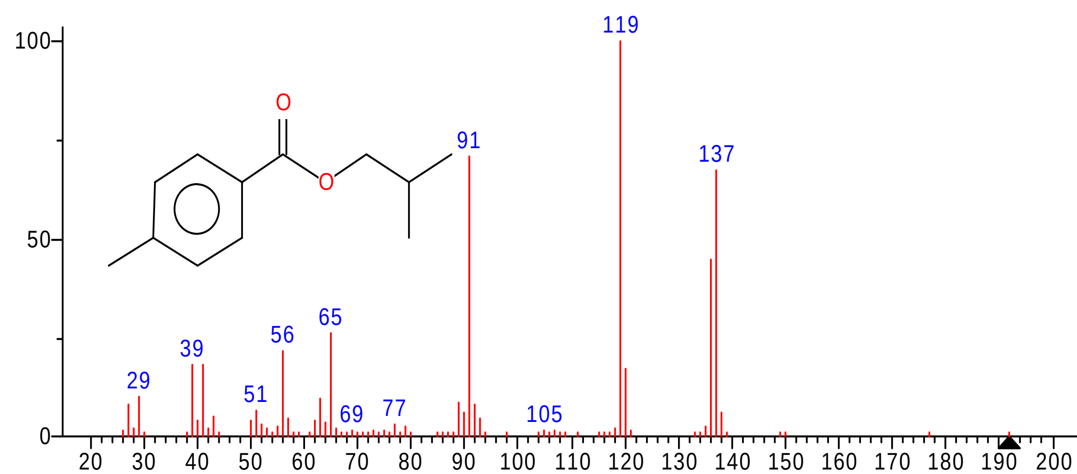
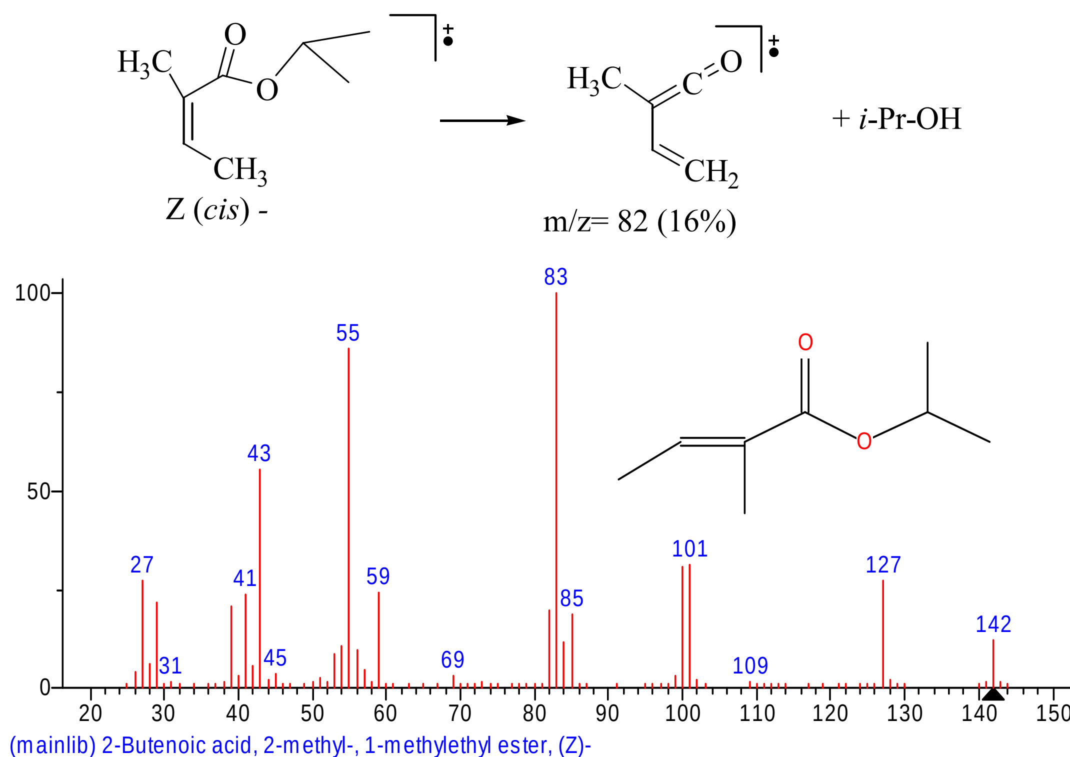


Figura IV.4.15. *Spectele de masa ale esterilor metilici al acidului metil-benzoic(o, m, p)*

Pentru izomerul *meta* intensitatea ionului de masa 118 este de 1.6% iar pentru izomerul *para* de 1%, deoarece acestia nu pot adopta starii de tranzitie ciclica de sase atomi.

In cazul izomerilor *cis-trans* olefinici diferentele intre intensitatile ionilor proveniti din aceasta fragmentare sunt mai mici (dar intotdeauna sesizabili) datorita transformarii. Astfel, daca consideram drept exemplu cazul esterilor izopropilici al acidului 2-metil-2-butenoic, din analiza spctrelor de masa (fig. IV.4.16), se obsera ca intensitatea ionului de masa 82, care corespunde starii de tranzitie ciclica de sase atomi (schema de mai jos), este mai mare in cazul de Z(*cis*)-esterului izopropilic al acidului 2-metil-2-butenoic (16%) comparativ cu E(*trans*)- (13%):



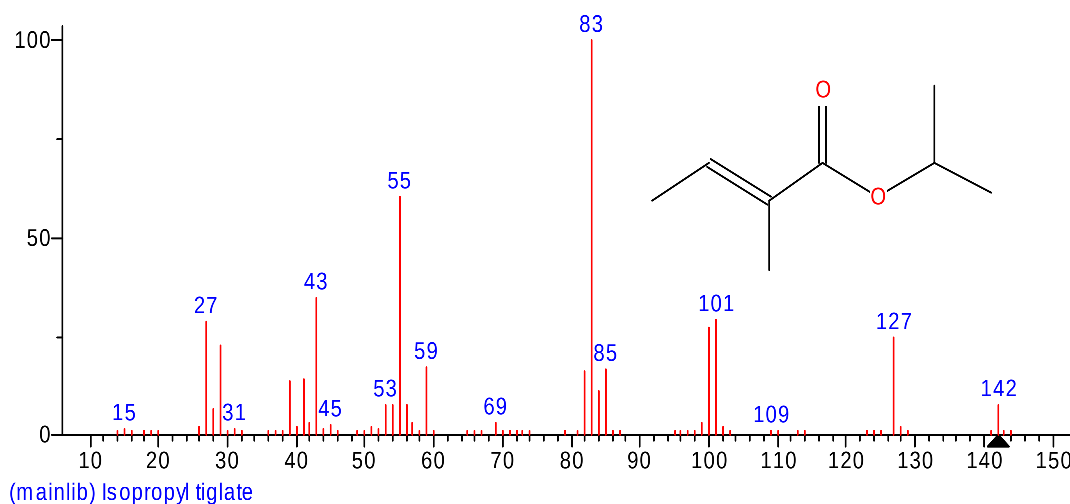
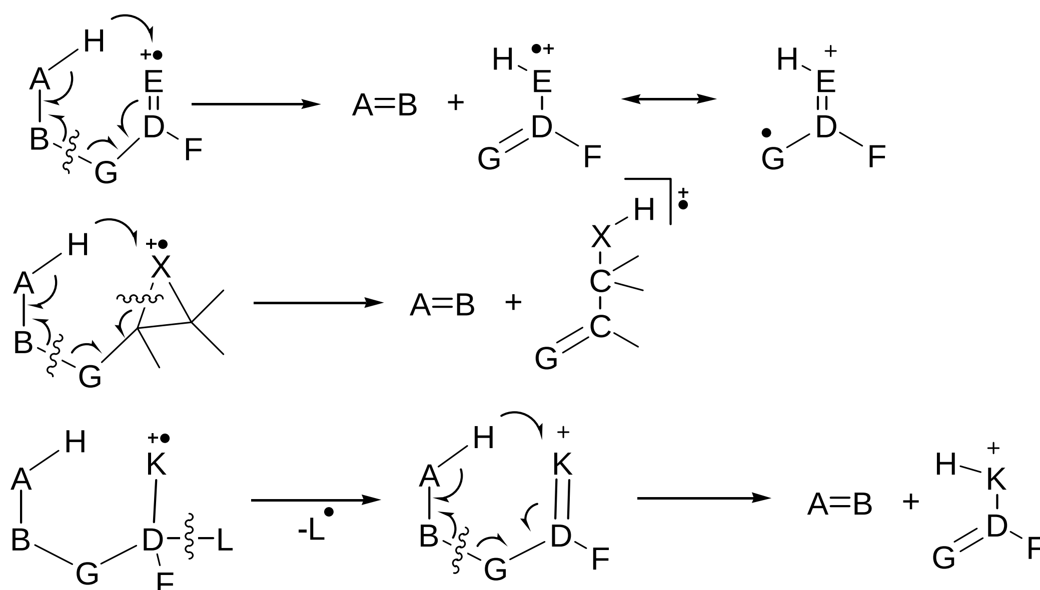


Figura IV.4.16. *Spectrele de masa ale esterilor benzilici al acidului 2-metil-2-butenoic, Z (sus) si E(jos)*

3. Transpozitia Mc Lafferty

Acest mod de fragmentare se intalneste la ionii-radicali si intr-o masura mai mica la ionii cu un numar par de electroni, care contin cel putin o legatura multipla sau un sistem analog si pot adopta stari ciclice de tranzitie incluzand 6 atomi.

In modul cel mai general, transpozitia McLafferty poate fi redata prin schemele:



unde A, B, D, E, F, G, K, L pot fi atomi sau grupe de atomi de diferite naturi, cu conditia ca molecula sa fie constituita rational. X poate fi O, N sau S.

Caracteristicile principale ale acestei fragmentari sunt:

- este necesara prezenta unui hidrogen pe atomul din pozitia 5;
- daca atomul din pozitia 5 este un carbon care poseda legaturi multiple transpozitia nu mai are loc;
- transpozitia si fragmentarea sunt strict sincrone, fapt dovedit prin lipsa efectului izotopic la compusii deuterati;
- sistemul trebuie sa permita o apropiere de cel putin 1,8 Å intre hidrogen si atomul pe care se transpune;
- usurinta cu care se transpune atomul de hidrogen creste in seria:

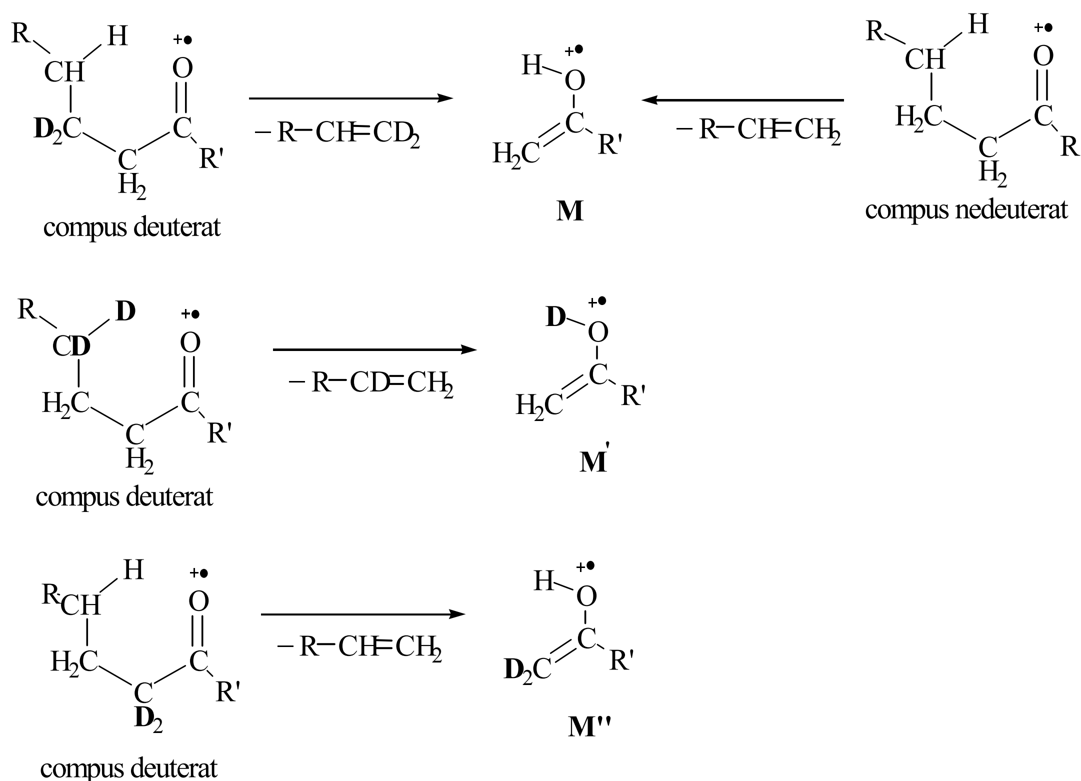


H-C primar $<$ H-C secundar $<$ H-C tertiar

- se elimina intotdeauna o molecula neutra;
- daca in urma unei rearanjari McLafferty rezulta un fragment ionic cu o structura corespunzatoare, acesta poate suferi o noua transpozitie McLafferty;

Din cele aratate rezulta ca transpozitia McLafferty se intalneste la olefine, sisteme aromatice cu catene laterale, compusi continand cicluri de 3 atomi, aldehide, cetone, acizi, esteri, amide, nitrili, etc.

Mecanismul acestei transpozitii a fost studiat pe compusii deuterati corespunzatori conform schemei:



unde:

R= alchil, aril

R^1= -H, -R, -OH, -OR, $-NH_2$, -NHR, $-NR_2$, etc

M, M^I, M^{II} sunt masele celor 3 fragmentari ionice.

Deoarece in toate cazurile s-a gasit ca $M= M^I-1= M^{II}-2$ rezulta ca transpozitia este starea specifica, hidrogenul migrand din pozitia γ fata de gruparea functionala.

Fragmentarea McLafferty furnizeaza picuri la urmatoarele mase minime: pentru aldehide 44, cetone 58, acizi 60, amide 59, esteri 74, etc. Eventualii substituienti la atomii fragmentului ionic conduc la mase diferite de cele indicate, dar usor previzibile.

Exemplu: cazul 2-hexanonei; din analiza spctrului de masa (fig. IV.4.17), se observa existenta unui pic semnificativ la masa minima 58, caracteristic pentru fragmentarea McLafferty a cetonelor.

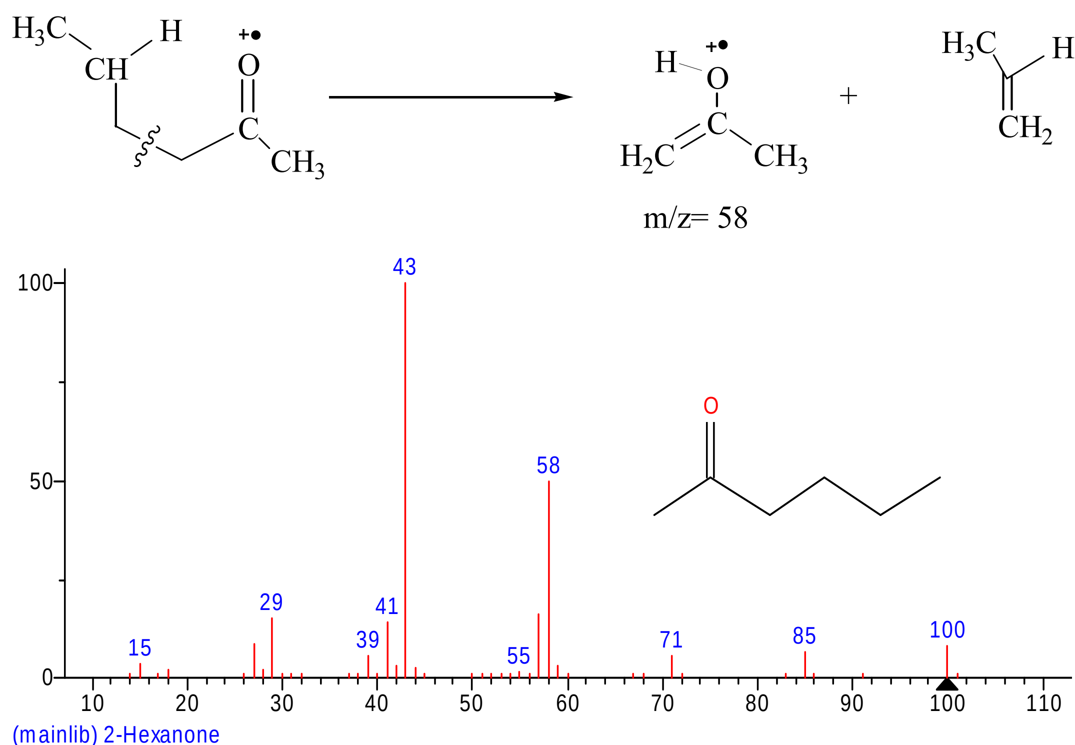
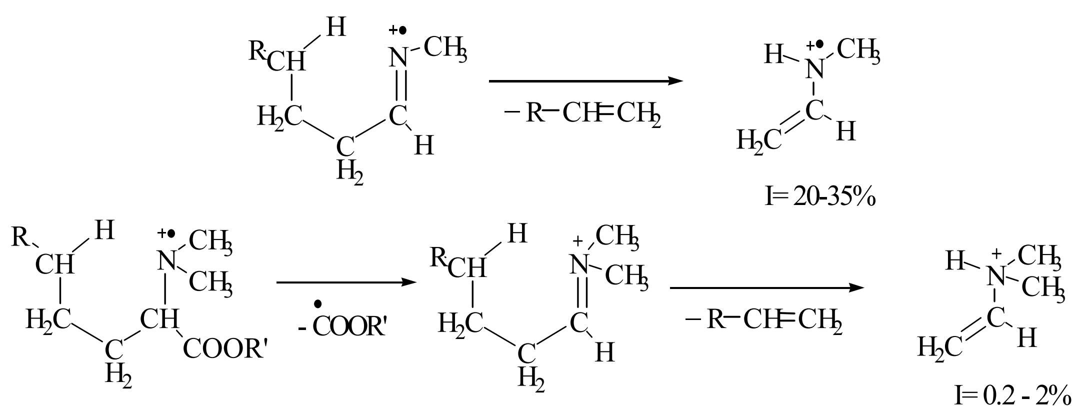


Figura IV.4.17. *Spectrul de masa al 2-hexanonei*

Prin compararea abundentelor fragmentelor ionice de transpozitie McLafferty furnizate de azometine si esterii α-aminoacizilor se remarca favorizarea acestui proces de catre ionii radicali.



In general picurile furnizate de transpozitia McLafferty sunt intense, in unele cazuri fiind picuri de baza.

4. Transpozitia hidrogenului in lanturi ionice de tip "oniu"

O serie de fragmente ionice de tip "oniu" pot suferi fragmentari insotite de transpozitiile unor atomi de hidrogen. Schema generala a reactiei de fragmentare este:

$$H-R-\overset{\bullet +}{X}-\underset{}{\overset{R''}{CH}}-R'-H \xrightarrow[-\dot{R}'']{} H-R-\overset{+}{X}=CH-R'-H$$

cale 1 / cale 2

cale 1: $H\overset{+}{X}=CH-R'-H + R-H$ (a) $\xrightarrow{-(R'-H)} H\overset{+}{X}=CH_2$

cale 2: $H-R-\overset{+}{X}=CH_2 + R'-H$ (b) $\xrightarrow{-(R-H)} H\overset{+}{X}=CH_2$

unde: X= O, S, NH, NR;

R, R'- resturi alchilice;

R'' – un rest care se scindeaza usor sub forma de radical.

Desi rezultatul final este acelasi, calea 1 este preponderenta (in spectru apar semnale furnizate de ionii de tip a). Fragmentarea dupa calea 2 devine importanta numai daca R=H, CH_3 sau daca daca R'>>R. Fragmentarile in continuare ale ionilor a si b conform schemei au loc numai daca R si R' sunt resturi alchilice mai mari decat CH_3. Existenta acestor fragmentari este dovedita de prezenta picurilor furnizate de fragmentele de masa minima:

$CH_2=NH_2^+ \rightarrow m/z = 30$ - in cazul aminelor secundare si tertiare;

$CH_2=OH^+ \rightarrow m/z = 31$ -in cazul alcoolilor secundari, tertiari si a eterilor;

$CH_2=SH^+ \rightarrow m/z = 47$ (47 + 14n) –in cazul tiolilor secundari, tertiari si a tioeterilor.

Daca consideram ca si exemplu cazul fragmentarii butil-isopropil- aminei (schema de mai jos), din analiza spctrului de masa (fig. IV.4.18), se observa existenta unui pic semnificativ la masa minima 30 (6%), caracteristic pentru fragmentarea de tip „oniu”.

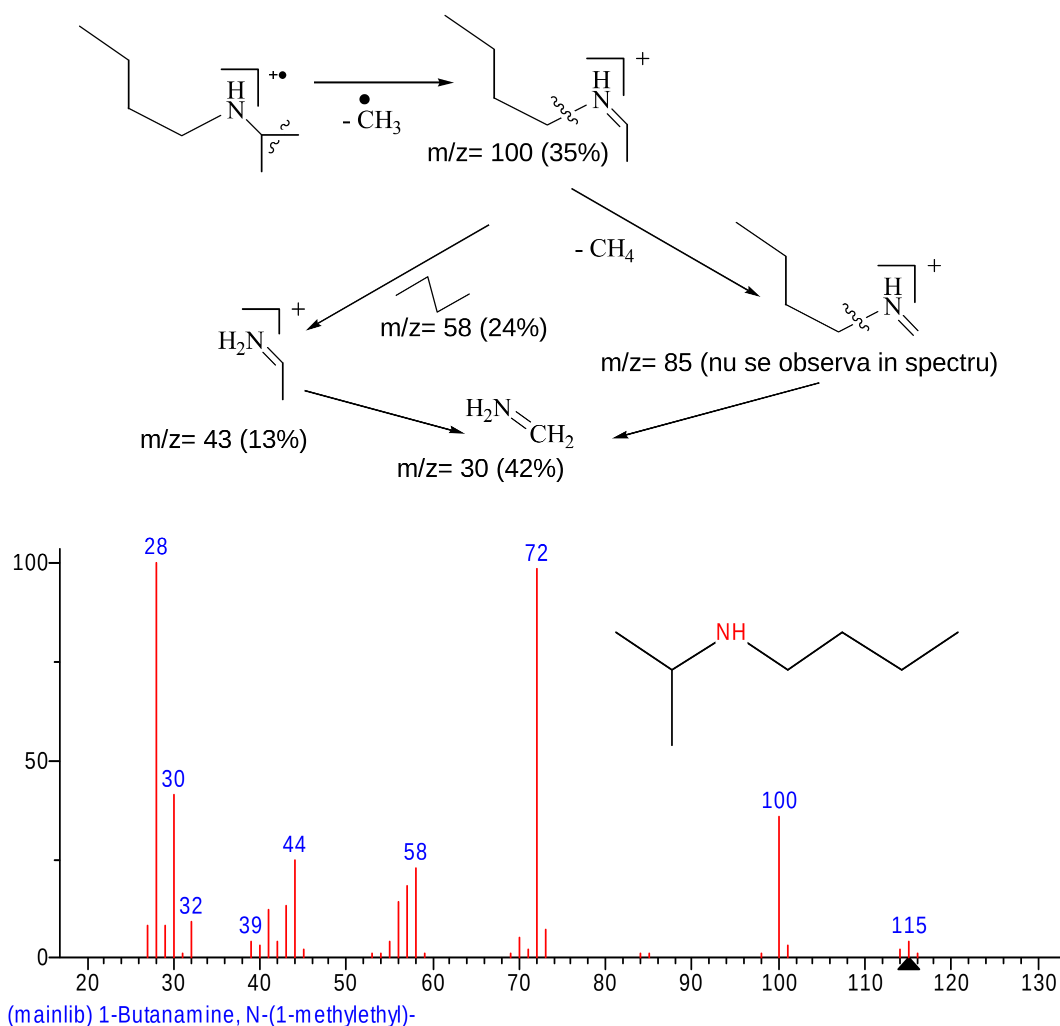


Figura IV.4.18. *Spectrul de masa al butil-izopropil- aminei*

Se va observa ca aceleasi fragmente se obtin si in cazul fragmentarii simple in α a alcoolilor, aminelor si tiolilor primari. Marcarea cu deuteriu a aratat ca in acest sens transpozitia hidrogenului este nespecifica.

6. Transpozitii ion-dipol

Fragmentarile care includ transpozitii specifice ale hidrogenilor de la centre ion-radicalice sau ionice la grupari dipolare se numesc transpozitii ion-dipol. Schematic ele se reprezinta dupa cum urmeaza:

unde: X= OH, NH;

Y= OH, OR, NH.

Transpozitiile de acest tip se intalnesc la diamine, dialcooli, esteri metilici ai hidroxi- si cetoacizilor, etc. Daca consideram ca si exemplu cazul fragmentarii esterului metilic al acidului 3-hidroxibutanoic (schema de mai jos), din analiza spctrului de masa (fig. IV.4.19), se observa existenta unor picuri semnificative la 103 (19%) si 71 (32%), caracteristice pentru fragmentarile de tip ion-dipol.

m/z= 103

m/z= 71

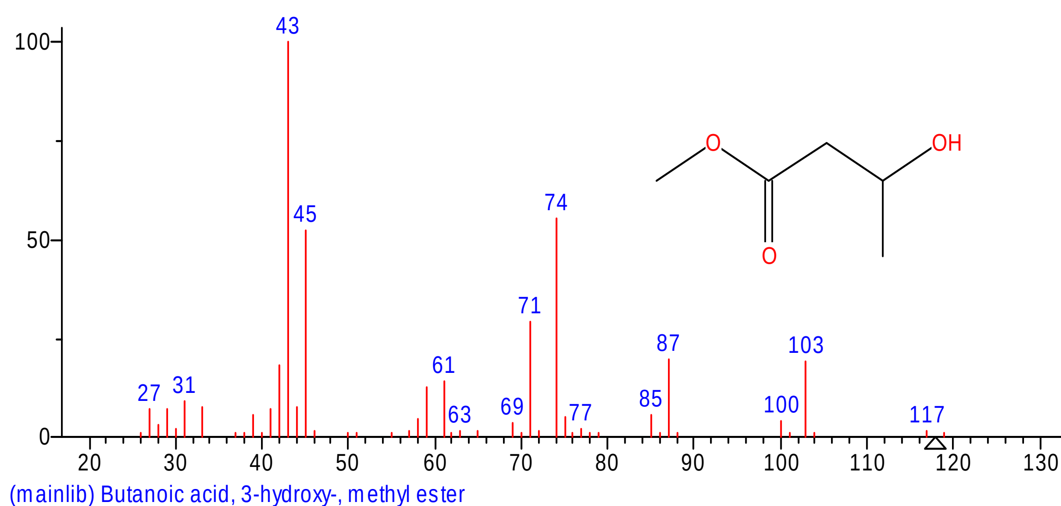
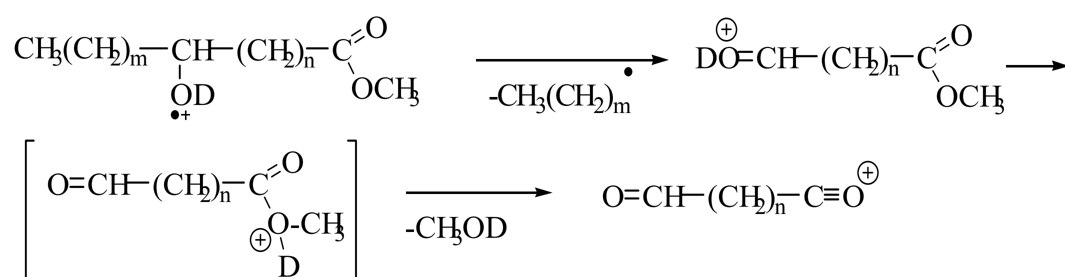


Figura IV.4.19. *Spectrul de masa al esterului metilic al acidului 3-hidroxibutanoic*

Prin marcare cu deuteriu s-a stabilit ca aceste transpozitii sunt specifice in privinta hidrogenului care migreaza si nespecifice in raport cu numarul gruparilor CH_2 care separa cele doua centre intre care are loc migrarea. Ca si exemplu consideram tor cazul unui hiroxi-ester:



IV.2.3. Fragmentari complexe

Ionii-radicali proveniti de la compusii ciclici substituiti cu heteroatomi, de la cicluri nesaturate sau continand un nucleu aromatic, cat si de la unii heterocicli aromatici, pot suferi o dubla sau tripla scindare insotita in multe cazuri de transpozitia unui hidrogen.

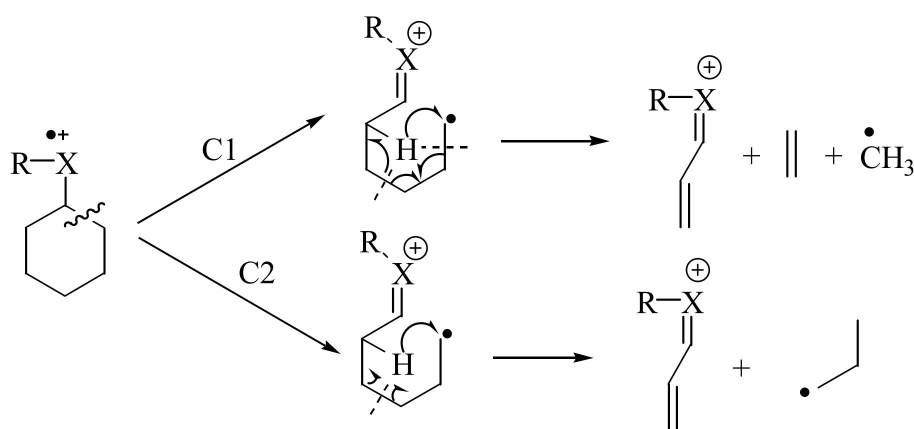
Intrucat in spectru nu apar decat picuri furnizate de ionii de fragmentare finali, numai prin marcari cu deuteriu si ^{13}C s-au putut deduce mecanismele acestor fragmentari. In multe cazuri mecanismele fragmentarii s-au dedus pe baza regulilor generale de fragmentare si a unor analogii.

Exista doua tipuri de fragmentari caracteristice:

- fragmentarile complexe ale ciclurilor alifatice substituite;
- fragmentarea retro-Diels-Alder.

1. Fragmentarile complexe ale ciclurilor alifatice substituite

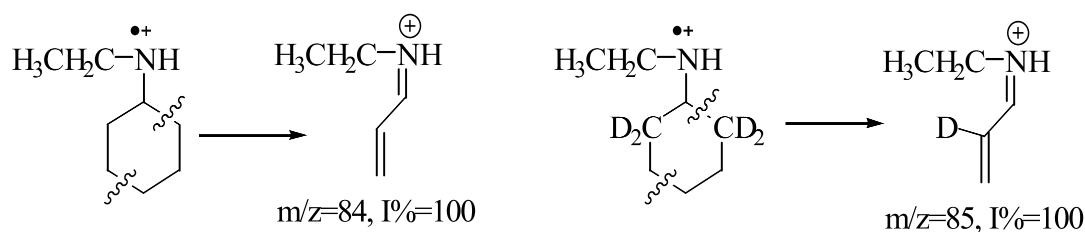
Schematic, fragmentarea compusilor care contin cicluri de atomi poate fi redata astfel:



unde: X= O, S, NH, NR

Ambele cai de fragmentare sunt posibile deoarece pot fi justificate prin consideratii de ordin energetic, iar fragmentele ionice finale sunt aceleasi. Un model pe care s-a studiat fragmentarea complexa a fost N-etil-ciclohexil amina si derivatul ei 2,6-tetradeuterat. Asa dupa cum se observa din spectrul de masa al aminei nedeuterate (fig. IV.4.20), in urma unei reactii de fragmentare complexe (schema de mai jos) rezulta fragmentul de la m/z= 84 (care este si pic de baza) iar

in cazul aminei deuterate acelasi tip de fragment are masa mai mare cu o unitate (m/z= 85, pic de baza):



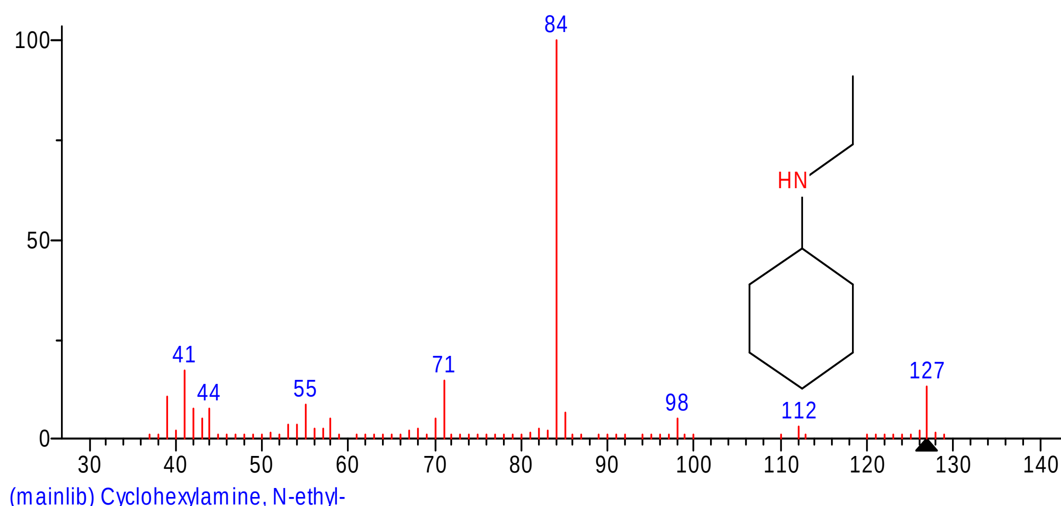
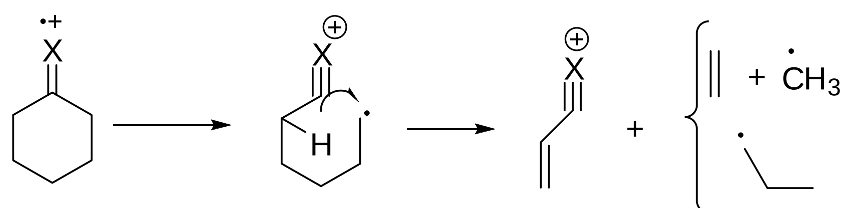


Figura IV.4.20. *Spectrul de masa al esterului etil-ciclohexil-aminei*

Doua caracteristici ale acestei fragmentari sunt mai importante:

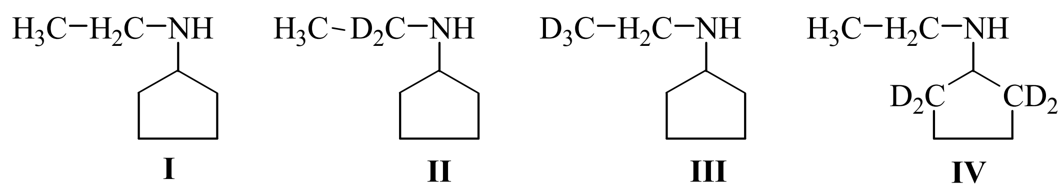
- transpozitia hidrogenului este in toate cazurile specifica (din 6 in 2 sau invers);
- intensitatea picurilor este in general foarte mare.

In mod analog se fragmenteaza si compusi cu heteroatomul dublu legat:



Si compusii care contin un ciclu de 5 atomi heterosubstituit se fragmenteaza complex. Un exemplu studiat in amanuntime pentru stabilirea mecanismului de

fragmentare a acestor cicluri l-a constituit N-etil-ciclopentilamina (I, fig. IV.4.21) si cei trei derivati deuterati ai sai (II, III si IV):



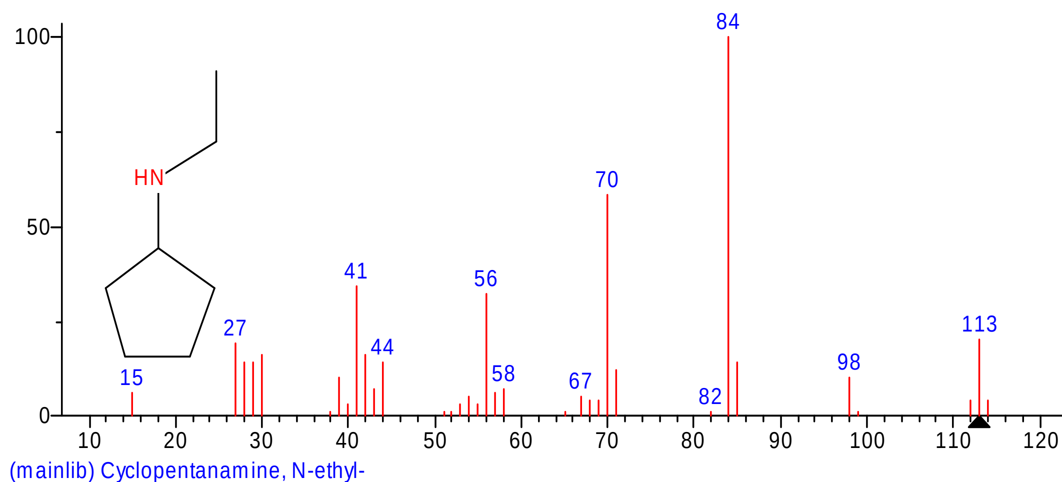
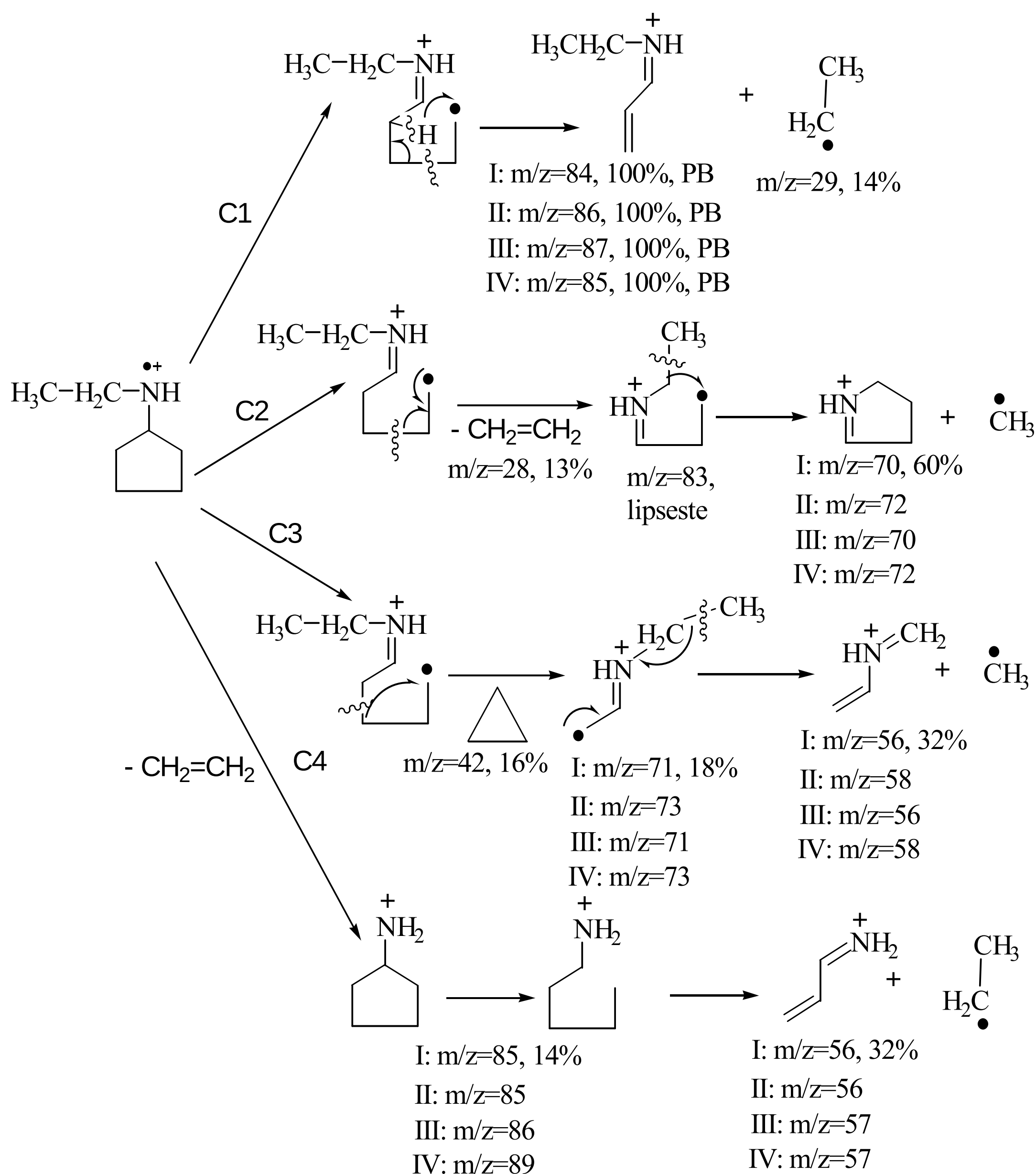


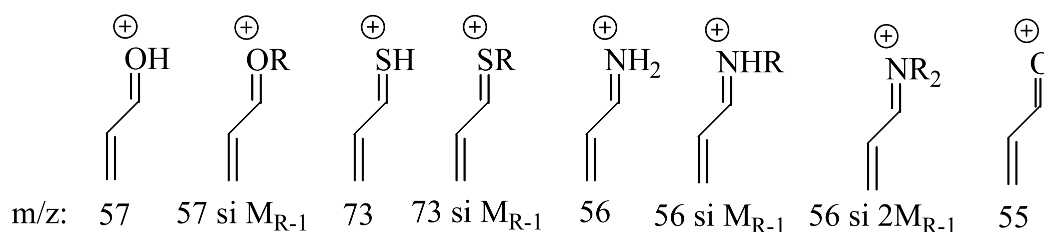
Figura IV.4.21. *Spectrul de masa al esterului etil-ciclpentil-aminei*

Schema generala a fragmentarii N-etil-ciclopentilaminei este urmatoarea:



Numarul de unitati de masa cu care se deplaseaza picurile de aproximativ aceeasi intensitate, din spectrele compusilor permite stabilirea ionilor cu schelet identic, dar cu continut diferit de deuteriu.

Structurile si masele principalilor ioni pozitivi care rezulta prin fragmentarea complexa a unor compusi organici mai des intalniti sunt:

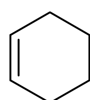
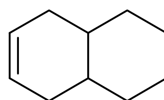
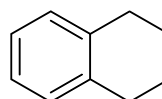


unde M_R este masa restului R.

Datorita prezentei, intensitatii si prin urmare a importantei lor pentru stabiliri de structura, aceste fragmente au fost numite „***fragmente cheie***".

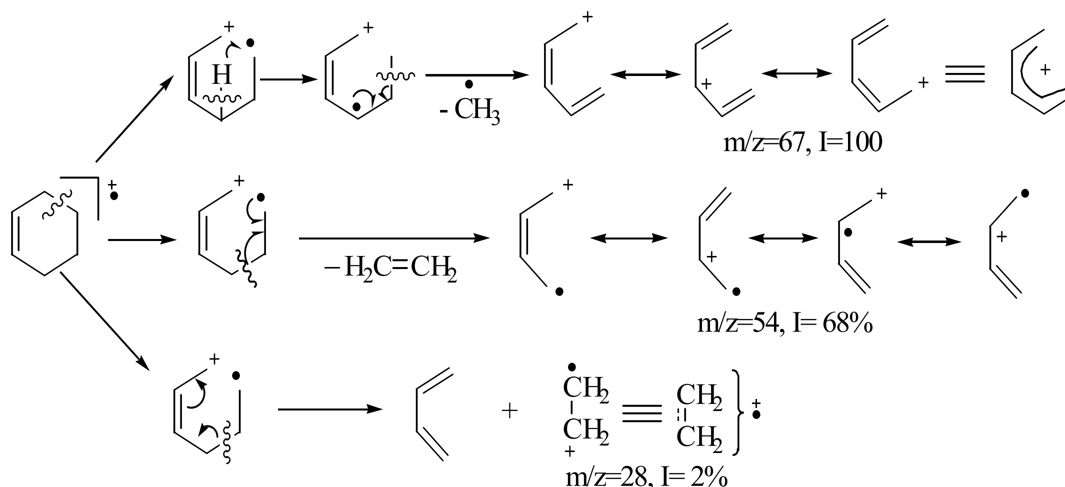
2. Fragmentarea retro-Diels-Alder

Este data de compusii ciclici care contin o dubla legatura sau un ciclu aromatic in locul acesteia:

Acest mod de fragmentare a fost intens studiat deoarece este des intalnit in clasa terpenelor si alcaloizilor.

Un exemplu tipic il constituie fragmentarea ciclohexenei (schema de mai jos):



Spectrul de masa al ciclohexenei este prezentat in fig. IV.4.22.

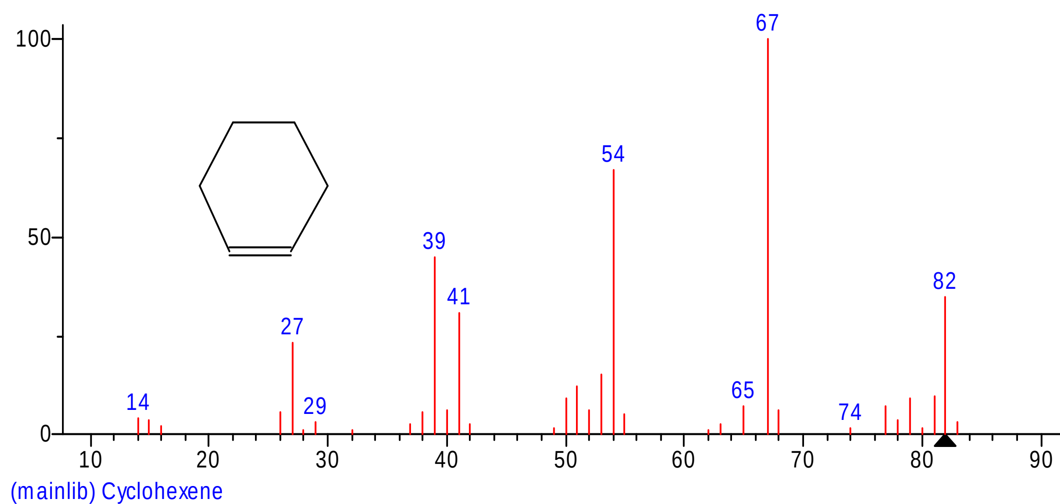
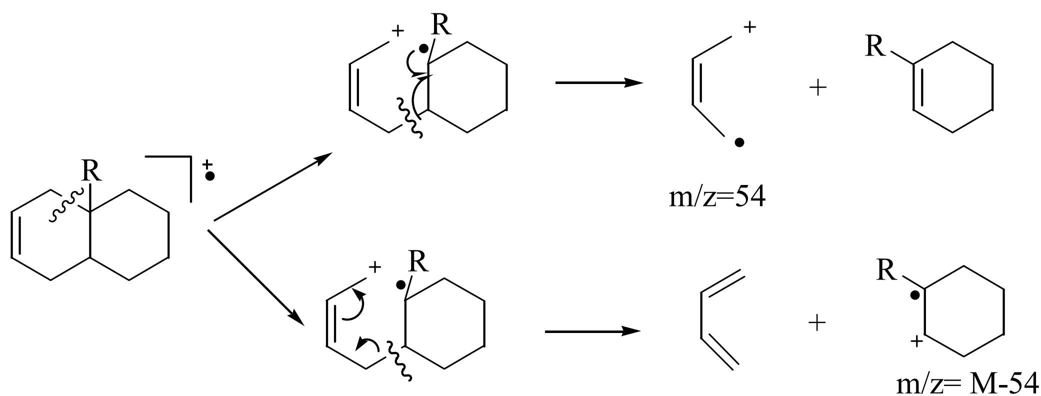


Figura IV.4.22. *Spectrul de masa al esterului ciclohexenei*

Daca in structura unor astfel de compusi sunt prezenti substituenti care pot conduce la modificarea intensitatilor acestor picuri, se poate ajunge pana la aparitia in spectru a unor picuri intense corespunzatoare fragmentelor etilenice. De exemplu, in cazul *trans*-Δ^2-octalinei si 9-metil- *trans*-Δ^2-octalinei rezulta:



Intensitatile relative ale celor doi ioni sunt:

m/z	I% cand R=H	I% cand R=CH_3
54	3,04%	1,18%
M-54	1,9%	19,1%

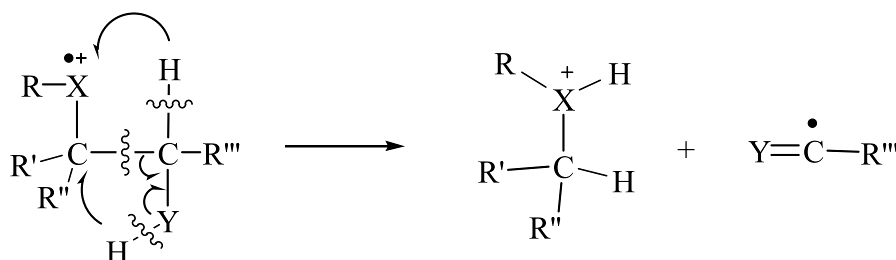
IV.2.4. Fragmentari insotite de transpozitia a doi atomi de hidrogen

Prezenta in spectrul de masa a unor picuri cu doua unitati de masa mai mari decat cele prevazute prin fragmentarile simple previzibile in cazul compusilor respectivi, a condus la presupunerea confirmata ulterior prin studii sistematice, ca in timpul fragmentarii, doi atomi de hidrogen se transpun de la fragmentul neutru la cel ionic. Compusii la care se intalneste aceasta fragmentare sunt multi, dar pot fi impartiti in doua clase mai importante:

- compusi mono- sau polifunctionali cu legaturi σ;
- compusi mono- sau polifunctionali cu duble legaturi.

1. **Compusi mono- sau polifunctionali cu legaturi σ**

Procesul de frag,mentare poate fi redat prin urmatoarea schema:



unde: X= O, S;

Y= O, S, CH_2 (in multe cazuri X = Y = O, S);

R, R’, R’’, R’’’ – grupe alchil sau atomi de hidrogen.

Se vor fragmenta in acest mod, prin urmare: alcoolii, tiolii, 1,2-tiolii, 1,2-tiol-alcoolii, derivatii lor alchilati precum si unii epoxizi. Un exemplu ilustrativ il constituie fragmentarea 1,2-propandiolului (spectru de masa este redat in fig/ IV.4.23) prezentata mai jos:

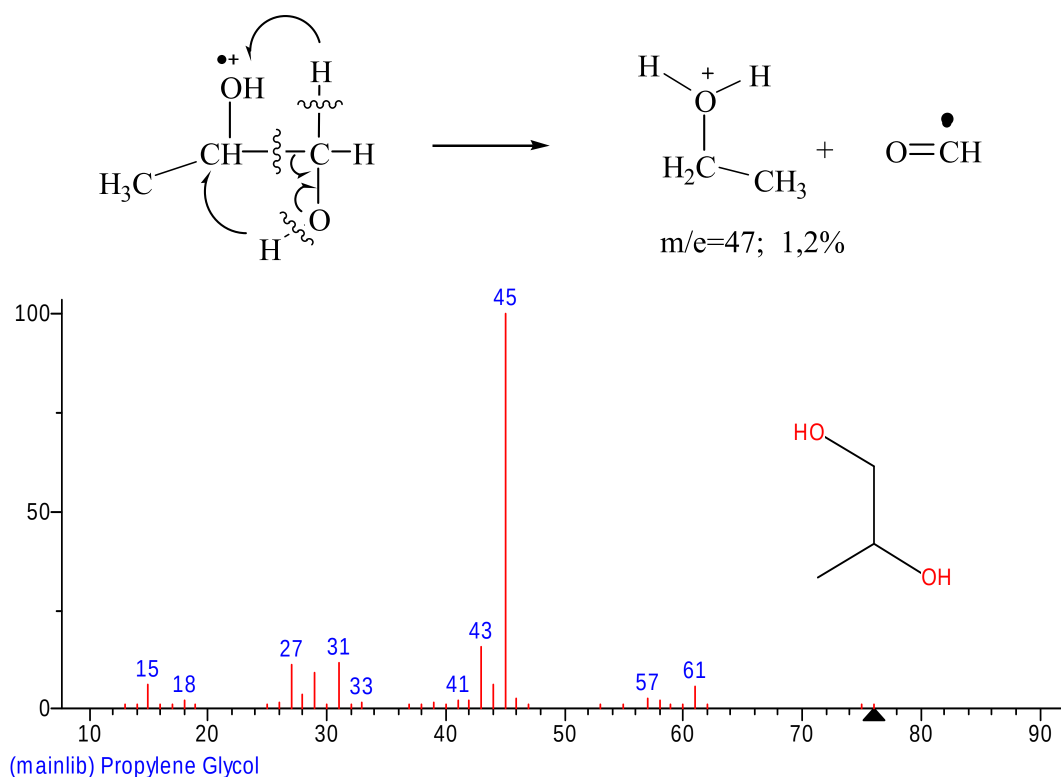
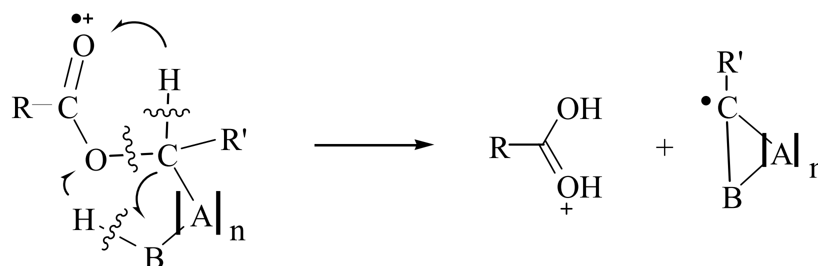


Figura IV.4.23. *Spectrul de masa al 1,2-propandiol*

Ionul format este tocmai etanolul protonat a carei formare si stabilitate in mediul acid este bine cunoscuta.

2. Compusi mono- sau polifunctionali cu duble legaturi

Marea majoritate a fragmentarilor de acest tip decurg conform urmatoarei scheme de fragmentare:



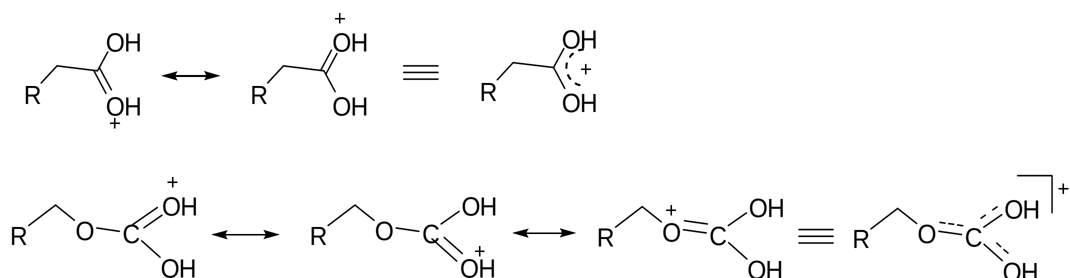
unde: R poate fi: alchil, aril, heteroaril (adesea R = OR_1);

A poate fi: $-CH_2-$, -CHR-, -S-, -O-; n= 1, 2, 3; (adesea A = $-CH_2-CH_2-CH_2-$, -CH_2-O-CH_2-, $-CH_2-CH_2-O-$) ;

B poate fi: $-CH_2-$, >CHR, O si S;

R' si R_1 –radicali hidrocarbonati cu diferite structuri.

In multe cazuri, datorita concurentei altor procese de fragmentare, intensitatile picurilor furnizate de ionii de dubla transpozitie sunt mici sau foarte mici. Totusi, cand ionul rezultat are o structura care stabilizeaza puternic sarcina pozitiva, acesta poate furniza picul de baza sau un pic cu intensitate mare. Asa se intampla in cazul unor esteri ai acidului carbonic. Stabilitatea mai mare a ionilor de dubla transpozitie rezultati din carbonati in comparatie cu ionii analogi proveniti din esterii acizilor organici se datoreaza puternicei lor stabilizari prin rezonanta.



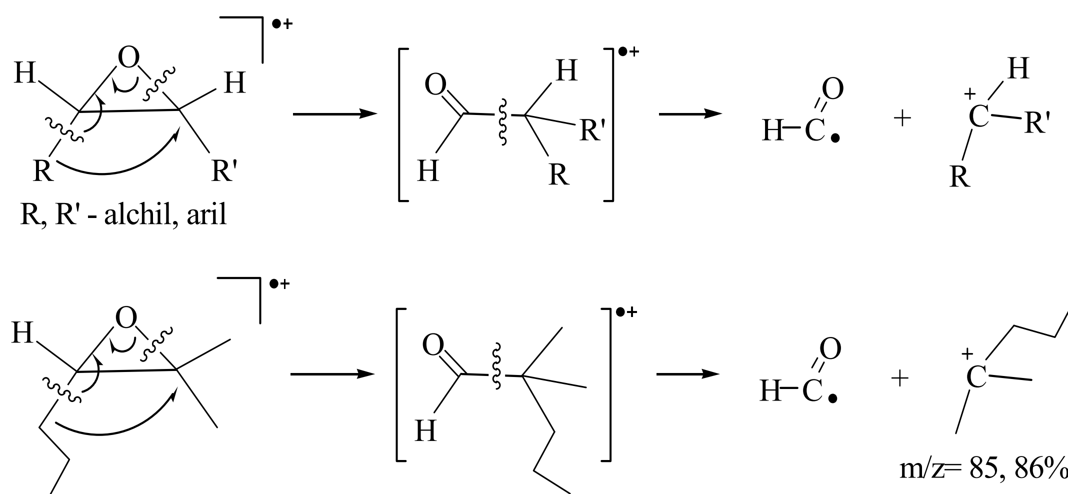
IV.2.5. Fragmentari insotite de transpozitii de schelet

Aceste fragmentari sunt insotite de transpozitii ale unor grupari alchil, aril, alcoxi, etc. Ele conduc la modificari profunde ale structurii compusilor organici si la eliminarea concomitenta a unor radicali sau molecule neutre cum ar fi: CO_2, CO, olefine, $H_2C=O$, HCN, S, SH_2, SO_2, etc

Acest mod de fragmentare se intalneste la foarte multe clase de compusi care contin legaturi duble, sisteme conjugate de legaturi duble sau cicluri mici si in marea majoritate a cazurilor hateroatomi.

Daca consideram cazul ciclurilor mici, fragmentarea epoxizilor decurge dupa schema de mai jos; ca si exemplu se considera cazul fragmentarii 2,2-dimetil-

3-propil-oxiranului, care conduce la un fragment cu intensitate mare la m/z=85 (spectru de masa in fig. IV.4.24) :



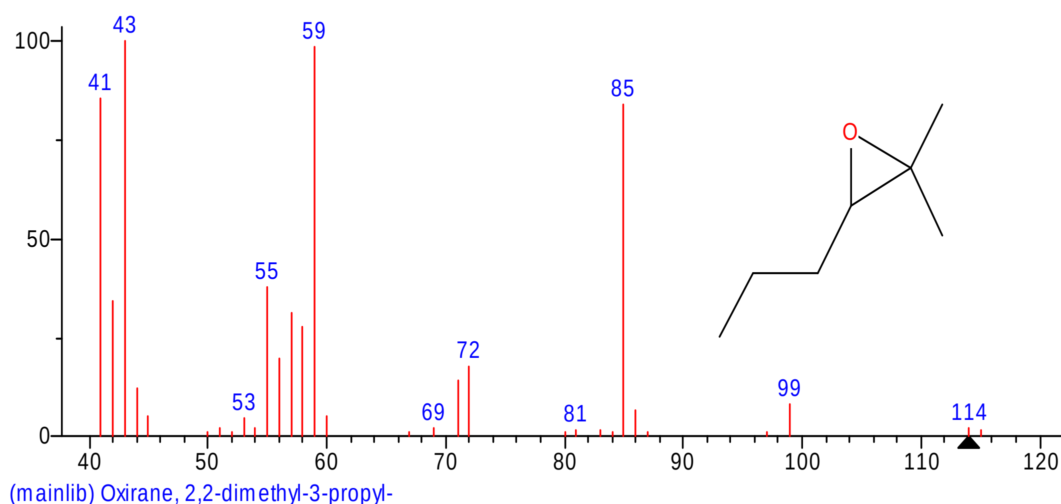


Figura IV.4.24. *Spectrul de masa al 2,2-dimetil-3-propil-oxiranului*

Studiul sistematic al fragmentarii 4-hidroxi-ciclohaxanonei si a unor eteri ai sai a pus in evidenta transpozitia unei grupari –OH sau –OR (schema de mai jos). Daca consideram ca si exemplu chiar cazul fragmentarii 4-hidroxi-ciclohaxanonei, aceasta va conduce la un fragment cu intensitate mare la m/z=60 (spectru de masa in fig. IV.4.25) :

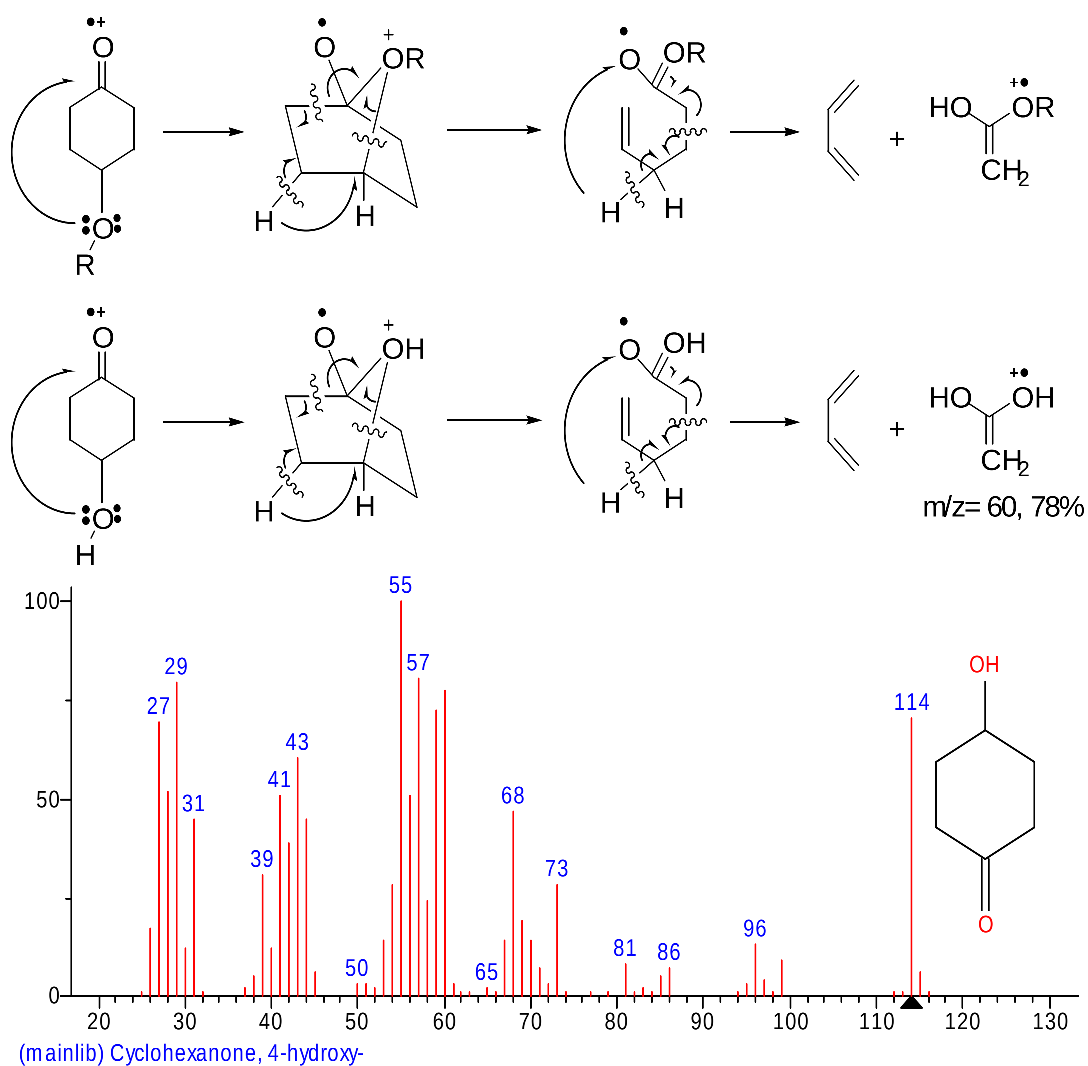


Figura IV.4.25. *Spectrul de masa al 4-hidroxi-ciclohaxanonei*

Esterii acidului carbonic, unii esteri α,β-nesaturati (mai rar) elimina usor CO_2 concomitent cu transpozitia restului legat de oxigenul grupei esterice (schema de mai jos). Daca consideram ca si exemplu cazul fragmentarii etil-2-metoxifenil-carbamatului, aceasta va conduce la un fragment la m/z=152 (spectru de masa in fig. IV.4.26) :

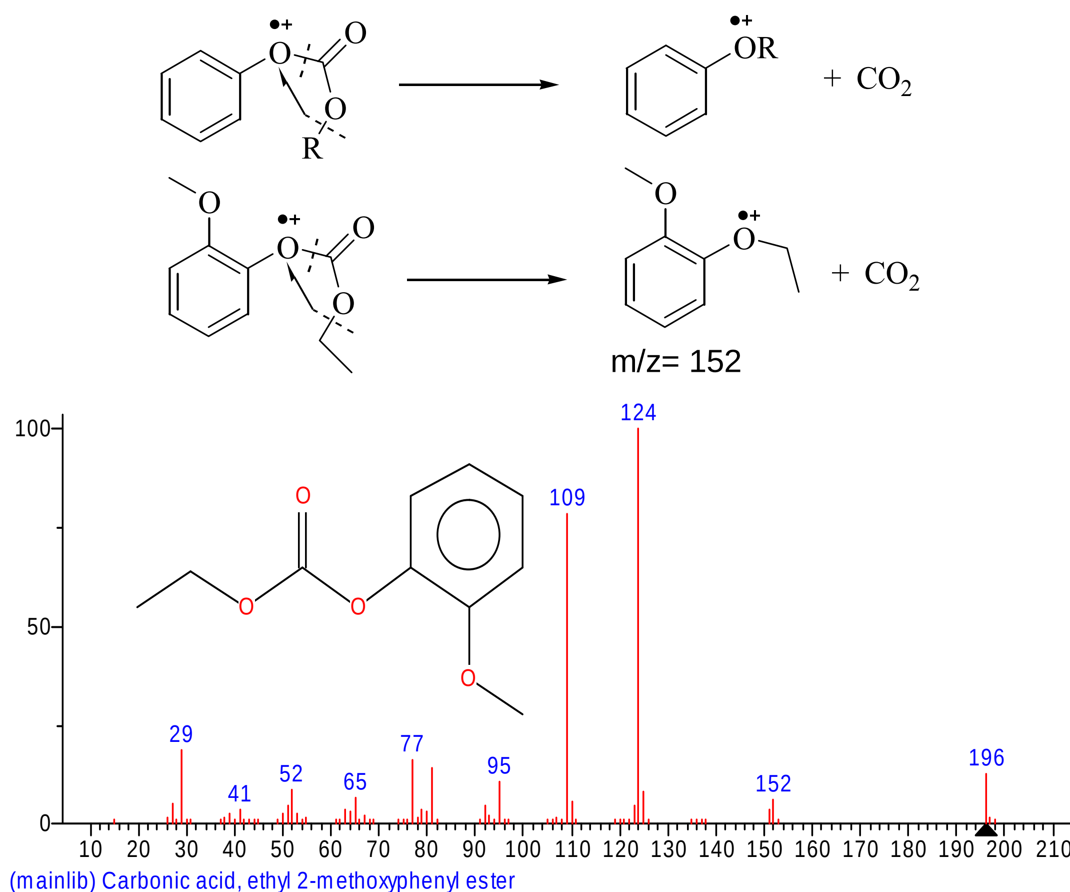
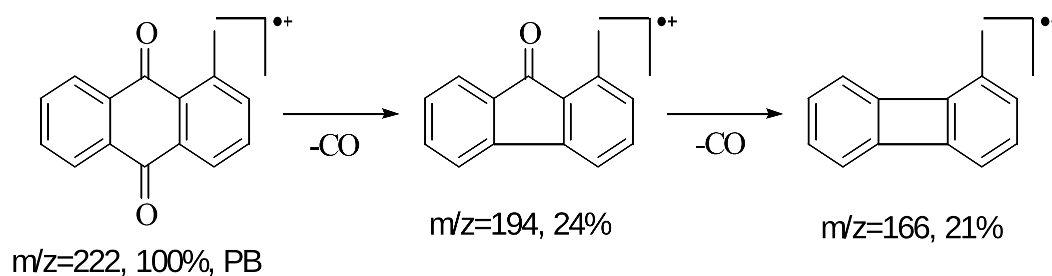


Figura IV.4.26. *Spectrul de masa al etil-2-metoxifenil-carbamatului*

Monoxidul de carbon rezulta prin fragmentarea cetonelor alifatice, aromatice, chinonelor, fenolilor, eterilor fenolici, etc. Daca consideram ca si exemplu ilustrativ cazul 1-metil-antrachinonei (schema de mai jos), fragmentarile de acet tip (eliminari succesive de CO) vor conduce la fragmentele semnificative de la m/z=194 si 166 (spectru de masa in fig. IV.4.27) :



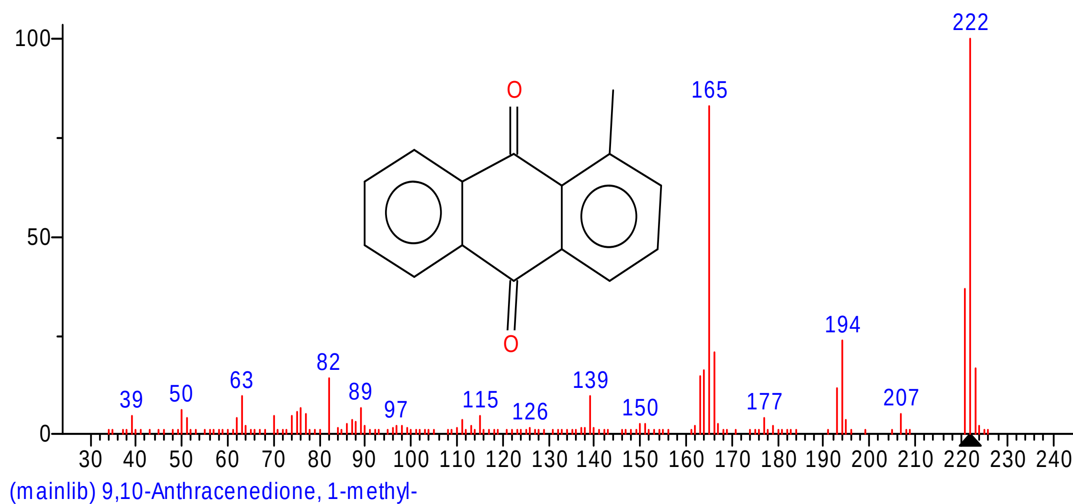


Figura IV.4.27. *Spectrul de masa al 1-metil-antrachinonei*

Eliminarea acidului cianhidric prin fragmentarea aminelor aromatice sau a unor amidine, a sulfului si a acidului sulfhidric prin fragmentarea sufurilor sau disulfurilor au loc de asemenea concomitent cu transpozitii de schelet.

V. APLICATII IN MEDICINA JUDICIARA

V.1. Probe care se utilizeaza in medicina judiciara. Generalitati

Modalitatea in care drogul/toxicul este conditionat si transportat

Tipurile de impuritati, produsi de degradare, produsi secundari sau solventi care sunt prezenti in probele de drog/toxic

Modalitatea in care proba drogul/toxicul se prezinta: in forma pura, amestec cu alte droguri, cu excipienti, cu adaos de produsi denaturati sau falsificati

V.2. Probe biologice

V.2.1. Introducere

Metabolizarea drogurilor/toxicelor

Administrare, transport, absortie, distributie si excretie

V.2.2. Fluide biologice

Singe, plasma, ser. Urina. Saliva

V.2.3. Tesuturi si fluide postmortem

Ficat, creier, bila, umoarea vitroasa, continut stomacal

V.2.4. Probe neconventionale

V.3. Pregatirea probelor

V.3.1. Extractia si cromatografia in strat subtire

V.3.1.1. Extracția

V.3.1.2. Cromatografia in strat subtire

V.3.2. Pretratamentul si prepararea probelor

V.3.3. Derivatizarea chimica in medicina judiciara

V.3.3.1. Reactii chimice utilizate in procesul de derivatizare

V. APLICATII IN MEDICINA JUDICIARA

In toxicologia medico-legala, separarea, identificarea si dovedirea structurii diverselor substante, a capatat o importanta hotaritoare atit in cazul drogurilor ilegale cit si in cazul otravurilor (introduse accidental sau cu scopuri criminale).

Evolutia permanent ascendenta a prformantelor instrumentelor folosite in chimia analitica pe parcursul ultimilor ani, a avut o influenta determinanta asupra dezvoltarii tehnicilor de laborator din medicina judiciara. Asa dupa cum s-a mai spus, printre metode instrumentale cele mai utilizate de catre specialistii in medicina judiciara, se numara gaz cromatografia cuplata cu spectrometria de masa (GC-MS).

In cele ce urmeaza, pe linga tratarea notiunilor de baza folosite in medicina judiciara in domeniul GC-MS, un accent deosebit se va pune judiciara pe informatiile in domeniu din ultimii 10 ani. Sunt vizate atit metodele de detectare si de analiza a drogurilor cit si a metabolitilor lor in diversele fluide biologice si tesuturi. In prezent pe linga GC-MS, o raspindire destul de larga incepe sa aiba LC-MS si GC-MS-MS.

V.1. Probe care se utilizeaza in medicina judiciara. Generalitati

Marea diversitate a probelor utilizate in medicina judiciara (probe biologice, de apa, de sol, etc), rigurozitate impusa de practica judiciara, impune o anumita conduita in prelevarea si pregatirea probelor ce urmeaza a fi analizate. Indiferent ca sunt prezentate ca dovezi in procese, in anchete criminalistice, in depistarea cazurilor de dopaj la sportivi, in accidente de munca, etc., probele trebuie sa indeplineasca anumite standarde si rigori, fara de care nu pot avea valoare judiciara.

Pregatirea probelor pentru analiza in medicina judiciara impune prelevarea adecvata a probelor, conversia analititilor din probele de studiat in forma necesara analizei, efectuarea cel putin a unei masuratori analitice (dar de obicei sunt efectuate doua) si in final analiza, corelarea si interpretarea datelor obtinute. Procesul de pregatire este complicat si de faptul ca probele utilizate sunt mai intodeauna amestecuri complexe si din acest motiv este necesara o cunoastere aprofundata a caracteristicelor lor principale, care sa permita alegerea metodei de analiza cea mai potrivita si pe cale de consecinta si o interpretare corecta a datelor obtinute. Orice greseala in procesul de prelevare si manipularea a probelor poate duce la compromiterea lor.

Consumul de droguri a fost si este una dintre provocarile majore ale societatii moderne, atit din punct de vedere social si juridic cit si din punct de vedere al sistemului de sanatate. Costurile globale legate de de abuzul de droguri (costurile cu sanatatea si sociale, costurile legate de criminalitate), au fost estimate a fi de sute de miliarde de euro anual! Si sunt in continua crestere.

In cazul drogurilor si toxicelor, ca reguli general valabile pentru toate laboratoarele de criminalistica, trebuie sa se aiba in vedere urmatoarele aspecte:

1. Modalitatea in care drogul/toxicul este conditionat si transportat;
2. Tipurile de impuritati, produsi de degradare, produsi secundari sau solventi care sunt prezenti in probele de drog/toxic;
3. Modalitatea in care proba drogul/toxicul se prezinta: in forma pura, cu excipienti, cu adaos de produsi denaturati sau falsificati.

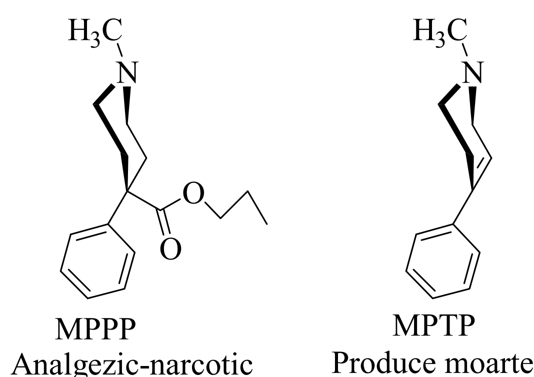
Modalitatea in care drogul/toxicul este conditionat si transportat

Practica criminologica a demonstrat ca drogul/toxicul poate fi conditionat si transportat in cele mai variate moduri, aceste modalitati fiind limitate doar de imaginatia infractorilor. Asa spre exemplu: extasy ca si tablete, capsule, pudra, mici bolovani; metamfetamina se poate prezenta ca si cristale transparente ("Gheata"); heroina ca si solutie injectabila, pulbere; clorhidratul de cocaina ca si

fulgi, cristale mari, pulbere fina, caramizi; LSD-ul ca si solutie injectabila sau impregnat in hirtie cu porozitate mare (hirtie de filtru); etc.

Tipurile de impuritati, produsi de degradare, produsi secundari sau solventi care sunt prezenti in probele de drog/toxic

O problema importanta ridicata in consumul de droguri ete “calitatea” lor, deoarece multe droguri contin impuritati. Aceste impuritati pot fi produsi de degradare, produsi secundari sau produsi initiali de sinteza (in cazul drogurilor sintetice), solventi. Identificarea impuritatilor este importanta din punct de vedere al efectelor toxice asupra organismului uman, unele dintre aceste impuritati producind boli grave sau chiar moartea. Asa spre exemplu, in procesul de sinteza a unui analgezic-narcotic (opioid) numit 1-metil-4-fenil-propionilpiperidina (MPPP) apare ca produs secundar (impuritate) 1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahydropiridina (MPTP) care este un toxic grav pentru organism, producind simptome ca si in boala Parkinson si moarte.



Determinarea provenientei impuritatii nu este intodeauna usor de facut. Asa spre exemplu, in cazul heroinei exista inca diferente de opinii cu privire la provenienta monoacetilmorfinei (MAM). In general este admis ca 6-MAM este produsul de hidroliza al heroinei (produs de degradare) iar 3-MAM este un produs secundar de sinteza care rezulta prin acilarea incompleta a morfinei. Cu toate

acestea, s-a demonstrat ca 6-MAM poate fi sintetizat iar 3-MAM poate fi obtinut si prin hidroliza heroinei.

Identificarea impuritatilor este importanta si din punct de vedere al investigatiilor criminalistice, deoarece poate furniza informatii importante cu privire la:

- provenienta probei: sintetica sau naturala;
- modalitatea de sinteza a drogului;
- zona din care provine, circulatia drogului.

Daca consideram cazul cocainei, existenta unor impuritati in probe furnizeaza informatii pretioase dupa cum urmeaza:

- prezenta *cis-* sau *trans-* cinamoil-cocainei indica o *proba ilicita* extrasa din surse naturale;
- prezenta acidului cinamic indica o *proba licita* extrasa din surse naturale;
- prezenta ecgoninei, si/sau metilecgoninei, si/sau benzoilecgoninei, si/sau acidului benzoic, si/sau ecgonidinei, si/sau metilecgonidinei, etilecgonidinei, si/sau metilpseudoecgoninei indica o *proba licita* extrasa din surse naturale si/sau produsi de degradare;
- prezenta (+) cocainei, si/sau pseudococainei, si/sau alococainei, si/sau pseudoalococainei indica ca proba de cocaina este de natura sintetica.

Zona din care provine drogul, poate fi si ea dedusa din compozitia si cantitatea impuritatilor. Exemplu, compozitia (procentual, %) probelor de heroina (heroina si impuritatile prezente) functie de zona geografica de unde provine este prezentata in tabelul 1.

Tabelul 1. *Compozitia hrionei functie de aria geografica de provenienta*

Compus	Tara, compozitie %					
	Asia SE	India	Pakistan	Turcia	Iran	Nigeria
Heroina	81	75	72	51	72	87
6-Monoacetil-morfina	2,7	4,4	4,6	2,2	1,8	4,9
Acetilcodeina	6,2	3,0	4,9	3,7	5,4	2,2

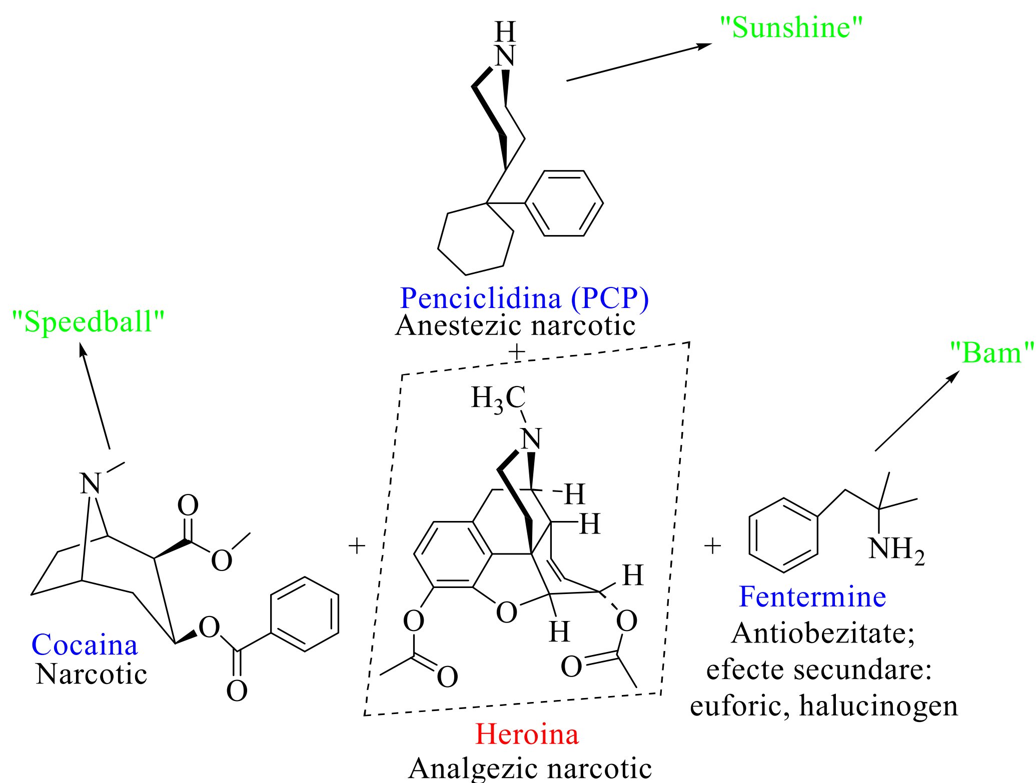
Cit priveste prezenta solventilor in probele de analizat, acestia exista atit in probele licite cit si ilicite, dar in cantitati mai mari in acestea din urma. Cei mai utilizati solventi in izolarea si/sau prepararea drogurilor sunt acetona, eterul si mai rar etanolul, si se gasesc in probele de analizat in proportii variabile, dar mici (sub 1%). S-a constata si o tendinta de a inlocui eterul cu metil etil cetona.

Modalitatea in care proba drogul/toxicul se prezinta: in forma pura, amestec cu alte droguri, cu excipienti, cu adaos de produsi denaturati sau falsificati

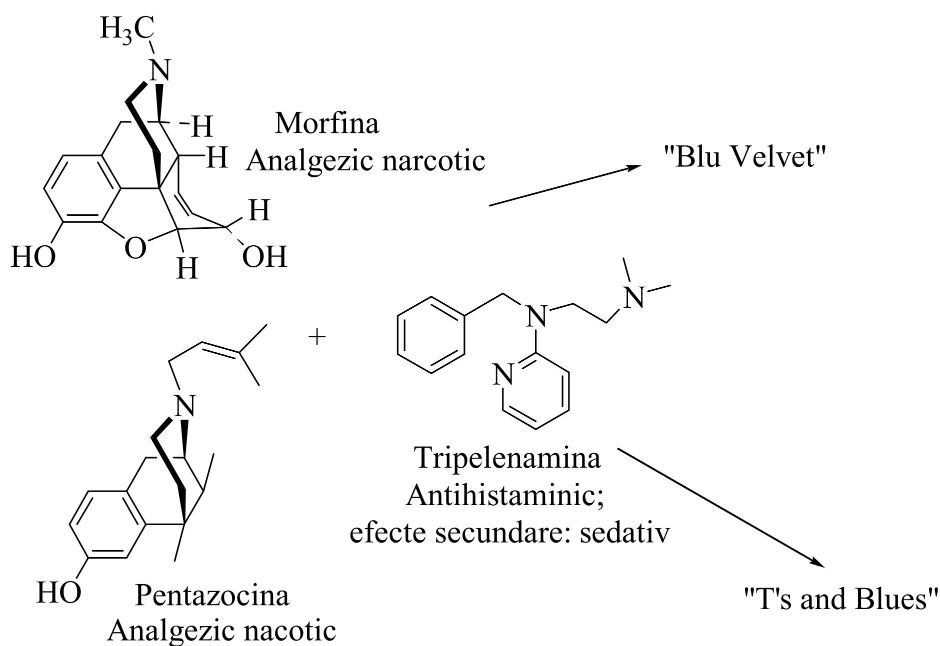
Din dorinta de a obtine efecte narcotice mai puternice sau alte tipuri de efecte, adesea drogurile se combina fie intre ele fie cu alte substante. De asemenea in practica criminologica trebuie sa se tina cont si de existenta produsilor de denaturare din probe si de posibilitatea ca anumite anumite droguri sa fie falsificate prin inlocuire cu alti produsi.

Amestecul de droguri si respectiv droguri-medicamente, este frecvent intilnit, si are in vedere complementaritatea efectelor halucinogene (sau de alta natura) a substantelor amestectecate. Printre cele mai frecvente combinatii amintim:

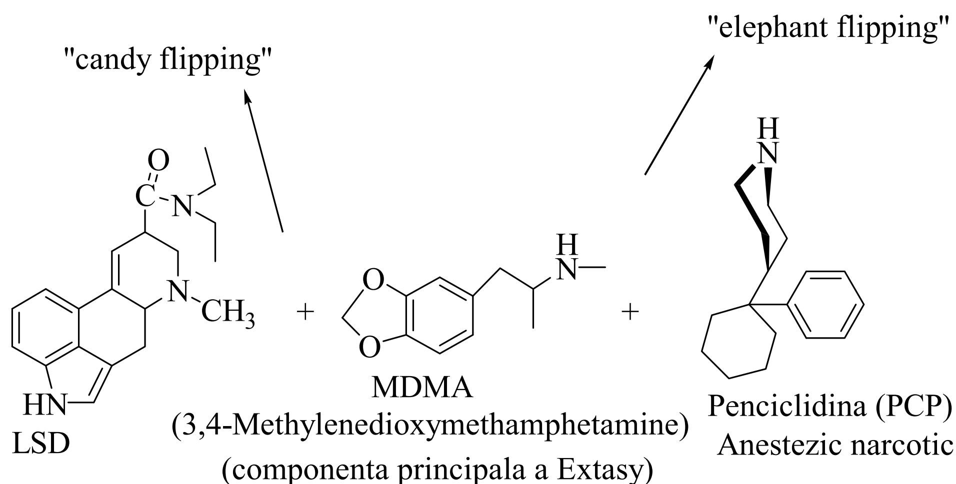
- heroina – penciclidina (PCP) ("Sunshine"); heroina – cocaina ("Speedball"); heroina - fentermin ("Bam");



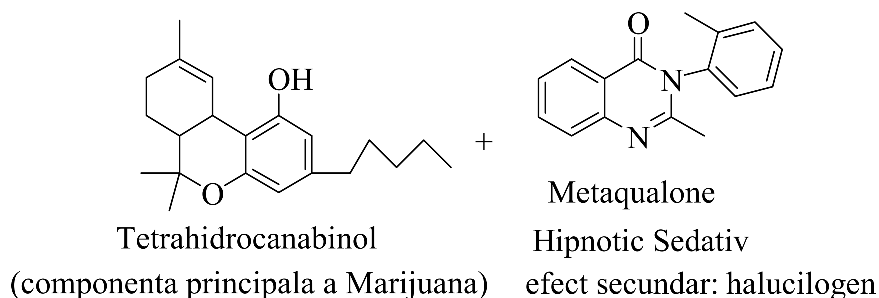
- morfina – tripelenamina ("Blue Velvet"); pentazocina – tripelenamina ("T's and Blues"); cocaina – metamfetamina ("Hits or Loads");



- exatasy – LSD ("candy flipping"); extasy – PCP ("elephant flipping");



- marijuana (canabis) – metaqualona; marijuana – penciclidina; droguri – alcool; droguri – deprimante ale sistemului nervos.



Tetrahidrocanabinol
(componenta principala a Marijuana)

Hipnotic Sedativ
efect secundar: halucilogen

Amestecul de droguri cu excipienti sau cu produsi care denatureaza probele este de asemenea un caz de interes in in medicina judiciara. Ca si excicpienti se folosesc diversi componenti (in diverse forme de agregare) cum ar fi: diluanti, lubricanti, lianti, coloranti, dezintegranti si odorizanti. Iata citeva exemple de excipienti mai des intilniti: zaharuri (glucoza, lactoza, sucroza, fructoza, etc.), caolinul (sulfat de bariu), talc, amidon, celuloza, vitamina C, sulfat de calciu, carbonat de calciu, bicarbonat de sodiu, etc. De exemplu in cocaina de calitate inferioara („crack cocaine") se gaseste o cantitate importanta de bicarbonat de sodiu.

Produsi care denatureaza probele sunt destul de utilizati pe piata ilicita a drogurilor pentru a pacali consumatorii. Exemple: in heroina se adauga chinina care da gustul amar al probelor de heroina (pe care de obicei consumatorii il asociaza cu probele autentice); in cocaina contrafacuta se adauga acid benzoic care da miros specific asociat cu probele autentice.

V.2. Probe biologice

V.2.1. Introducere

In mod obisnuit probele biologice utilizate in medicina judiciara sunt fluide biologice si tesuturi. O caracteristica esentiala a probelor biologice o constituie faptul ca ele au o compozitie extrem de complexa iar concentratia drogurilor/toxicelor este extrem de mica. Mai mult de atit, o parte din aceste droguri/toxice sunt metabolizate (partial sau total) ceea ce duce la aparitia in fluidele biologice a unor metaboliti. Exista situatii in care drogul/toxicul se combina cu alte substante prezente in probele biologice facind si mai complicata situatia. Din aceste motive atunci cind un specialist in medicina judiciara analizeaza o proba biologica, trebuie sa aiba in vedere totalitatea acestor aspecte altfel proba devine inutilizabila in medicina judiciara.

Cle mai comune fluide biologice sunt singele, plasma sau serul, urina si in ultima perioada saliva. Tesuturile si fluide postmortem (toate tipurile) sunt utilizate atunci cind este posibil iar analiza lor este adeseori dificila. Probele neconventionale, in special par, unghii si oase, au inceput si ele sa cistige teren in medicina judiciara. Alegerea tipului de proba pentru analiza judiciara trebuie facuta cu atentie si nu trebuie subestimata. In tabelul 2 prezentam un exemplu pentru alegerea tipului de proba.

Tabelul 2. *Probe biologice: alegerea tipului de proba*

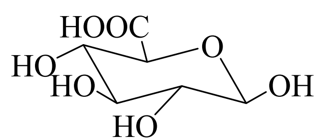
Tip de proba	Tipul de drog/toxic
Bila	Narcotice
Continut gastric	Drog/toxic ingerat oral
Creier	Deprimante ale SNC; etanol
Ficat	Toate tipurile
Grasimi	Solubile in grasimi; insecticide
Muschi	Toate
Oase	Intoxicatii cronice cu metale
Plamini	Inahalanti
Rinichi	Metale grele
Singe	Toate
Urina	Toate
Umoare vitroasa	Toate

Metabolizarea drogurilor/toxicelor

Odata patruns intr-un sistem biologic, drogul/toxicul sufera procese de metabolizare si degradare (reactii chimice si enzimatice). Acest proces de metabolizare are loc la nivelul anumitor organe si sisteme ale organismului si poate fi considerat ca un proces de autoapara re al organismului, prin care drogurile/toxicele sunt transformate in substante mai putin toxice, cu structura mai simpla (unii autori il considera ca un proce de detoxifiere). In prezent, pentru cvasimajoritatea drogurilor uzulale, caile lor de metabolizare si degradare precum si structura produsilor de metabolizare, sunt cunoscute.

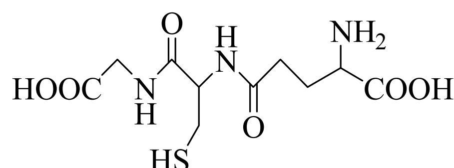
Metabolizarea drogurilor este impartita in doua etape:

- faza metabolica I sau faza reactiilor metabolice, cuprinde reactiile de hidroliza, oxidare si reducere;
- faza metabolica II sau faza reactiilor de conjugare, care cuprinde procesele de conjugare ale substantelor cu diversi compusi din organism cum ar fi aminoacizi (glutation, glutamina, etc) si acidul glucuronic.



Acid glucuronic

(toti substituientii sunt in ecuatorial)



Glutation (GSH)

De obicei in faza I se produc grupari fuctionale care dau reactii de conjugare in faza II. Aceste biotransformari se pot opri la grupari functionale si conjugati ai drogului/toxicului si/sau pot fi mult mai profunde, conducind la produsi cu structura mult mai simpla.

Exemplu: metabolizarea benzilpiperazinei (BZP; drog analog morfinomimetic), fig. V.2.1. Astfel, hidroxilarea sau dubla hidroxilare a BZP conduce la metabolitii **1, 2** si **6**. Acesti metaboliti sub actiunea enzimei pirocatehin-*O*-metil-transferaza (COMT) sufera un proces de metilare conducind la 4'-hidroxi-3'-methoxi-BZP, **7**. Toti produsii de hidroxilare ai BZP (**1, 2** si **7**), sunt transformati in *O*- glucuronoconjugati **8**. Acest proces este realizat sub actiunea coenzimei UDP- acid glucuronic (acid uridin 5'-fosfo-α-D-glucuronic) si este catalizat de enzima UDP-glucuroniltransferaza. Oxidarea BZP conduce initial la aldehida benzoica (**8**), care este oxidata mai departe la acid benzoic, **10**. Acidul benzoic poate rezulta si prin dezaminarea oxidativa a aminelor **4** si **5** (cind initial se formeaza benzaldehida). Acesti produsi de metabolizare se elimina prin urina si se pot determina prin GC-MS. Spectrele de masa ale BZP, piperazinei, benzilaminei si acidului benzoic sunt prezentate in fig. V.2.2-5, sunt usor de recunoscut si interpretat, existind in toate bazele de date.

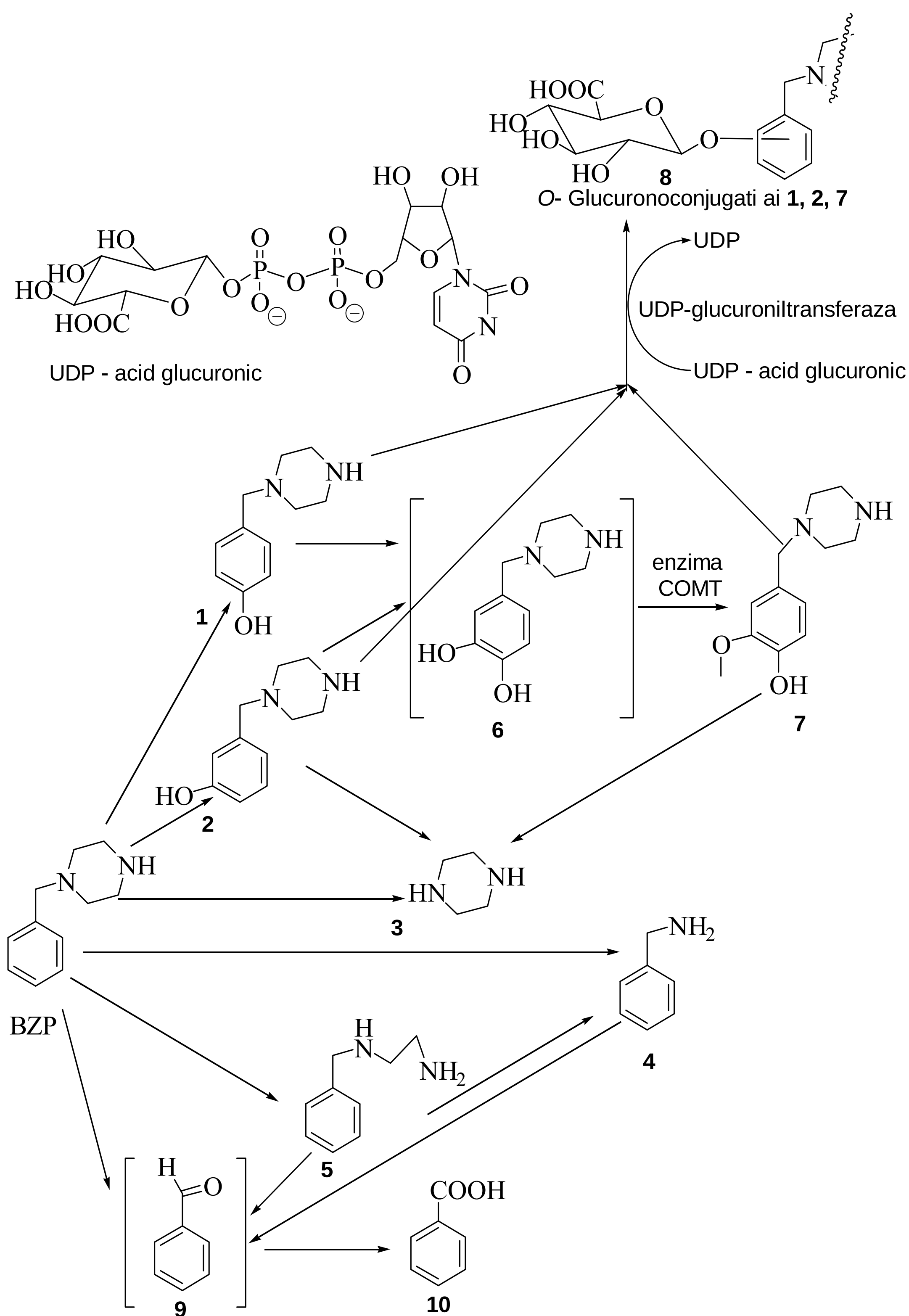


Figura V.2.1. Schema reactiei de metabolizare a BZP

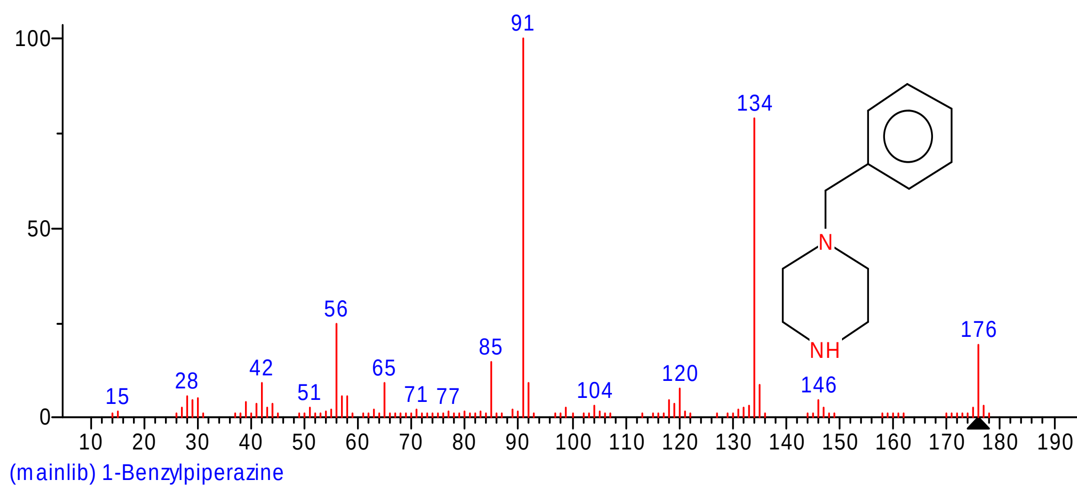


Figura V.2.2. *Spectrul de masa al BZP*

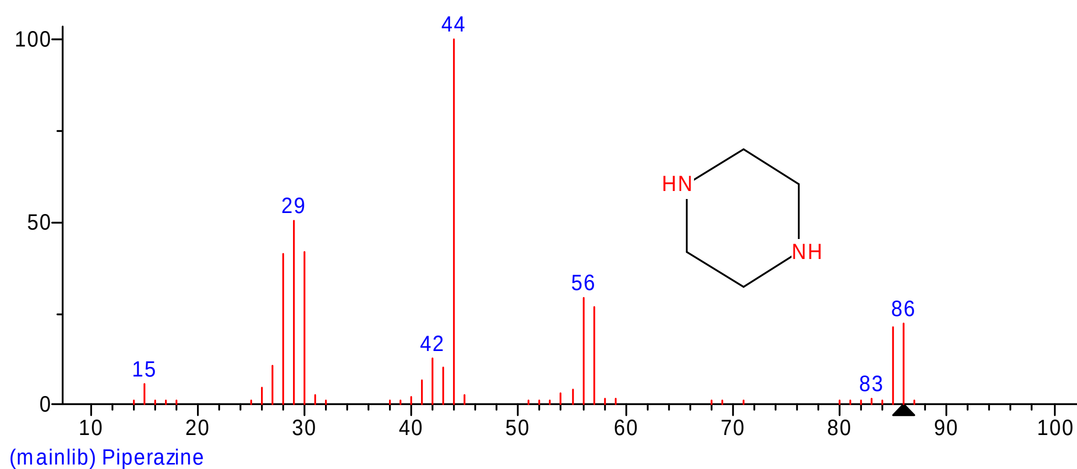


Figura V.2.3. *Spectrul de masa al piperazinei*

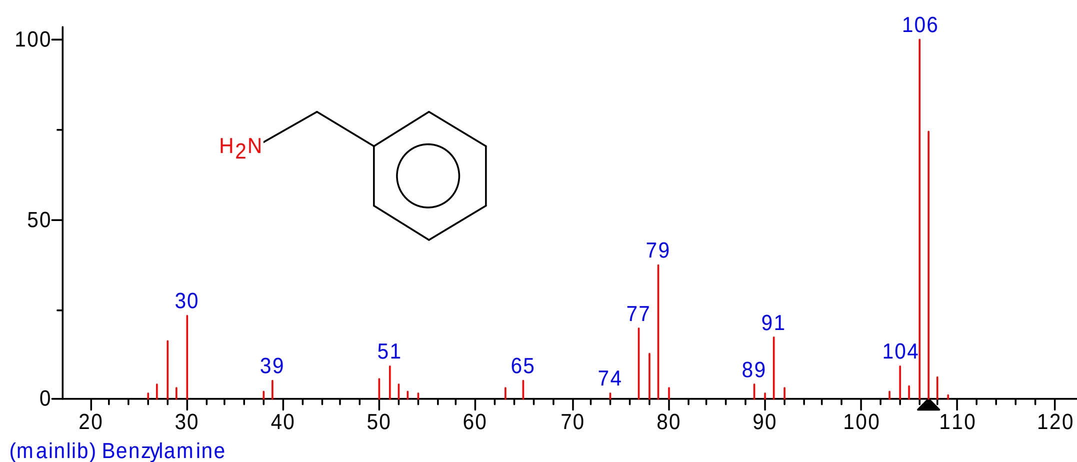


Figura V.2.4. *Spectrul de masa al benzilaminei*

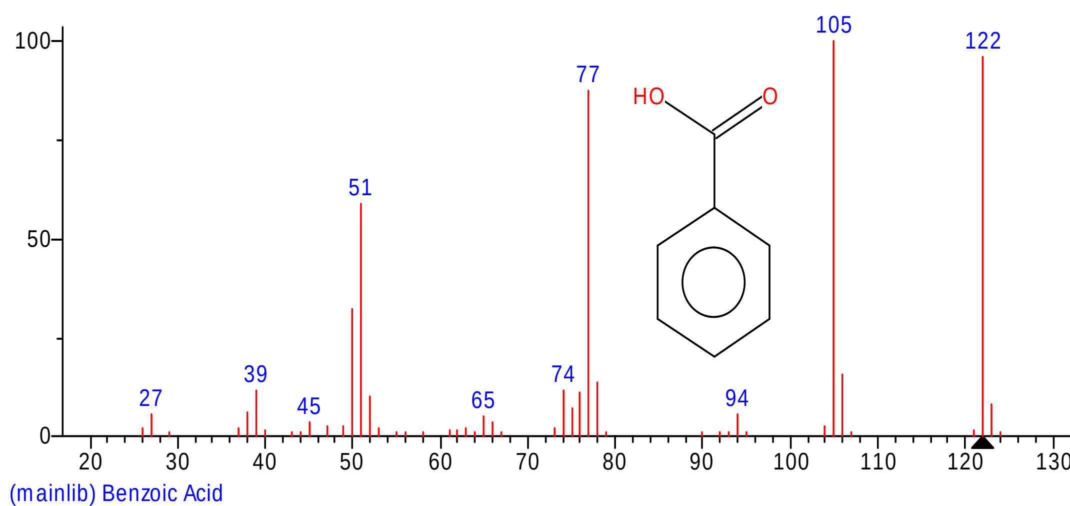


Figura V.2.5. *Spectrul de masa al acidului benzoic*

In tabelele 3 si 4 prezentam principalele biotransformari corespunzatoare fazelor metabolice I si II.

Tabelul 3*. Probe biologice: biotransformari corespunzatoare fazei I*

Tip de ractie	Transformare	Produs care rezulta
Oxidare		
ArH	Hidroxilare	Ar-OH
$-CH_3$	Idem	-COOH
$-CH_2$-R	Iden	-CH(OH)-R
-C-O(S)-R	*O(S)*- Desalchilare	C-O(S)-H
- CH_2-NH_2	Desaminare	-CHO
- CHR-NH_2	Idem	-COR
-NH-R	*N*-Desalchilare	$-NH_2$
R-C(=S)-R	Desulfurare	R-C(=O)-R
R-S-R	Sulfoxidare	R-S(=O)-R
Reducere		
-CH(R)=O	Reducere aldehide	$-CH_2$-OH(R)
$-NO_2$	Reducere	$-NH_2$
R-S-S-R	nitroderivati	R-SH
Ar-N=N-R	Reducere sulfuri	R-NH_2
Hidroliza	Reducere azoderivati	
-COOR		-COOH + HO-R
$-CONR_2$	Hidroliza esteri	-COOH + HNR_2

	Hidroliza amide	

***Tabelul 4**. Probe biologice: biotransformari corespunzatoare fazei II*

Gruparea functionala	Reactia conjugata	Agentul de conjugare
-O(S)H	Glucuronoconjugare	Acid glucuronic
	Glicozidoconjugare	Glucoza
	Sulfoconjugare	Sulfate
	Metilare	S-Adenozilmetionina;
		acid tetrahidrofolic-5-
	Acetilare	metilat
		Acetil coenzima A
-COOH	Glucuronoconjugare	
	Glicozidoconjugare	Acid glucuronic
	Aminoacidconjugare	Glucoza
		Glicina; Glutamina;
		Ornitina; Taurina
$-NH_2$	Glucuronoconjugare	
	Sulfoconjugare	Acid glucuronic
	Metilare	Sulfate
		S-Adenozilmetionina;
	Acetilare	acid tetrahidrofolic-5-
		metilat
ArX	Glutationconjugare	Acetil coenzima A
		Glutation

Administrare, transport, absortie, distributie si excretie

Orice substanta (drog/toxic/medicament, etc) poate patrunde intr-un organism viu pe diverse cai, cele mai importante fiind orala (ingestie), parenterala (intravenos, intramuscular, subcutan, etc), respiratorie, contact cu pielea sau mucoasele. Odata introdus in organism aceste substante sufera fenomentul de absortie, transport, distributie, metabolizare, eliminare.

Procesul de absortie a unei substante incepe practic din momentul in care substanta a fost introdusa in tesutul viu, si depinde de tipul substantei (hidrosolubila, liposolubila, marime, pH, etc), modul de administrare, mecanismul de absortie si de locul unde este absorbita majoritar substanta, dupa cum urmeaza:

- ingetia orala coduce la o absortie majoritar la nivelul stomacului si intestinului, prin mecanism de difuzie;

- inhalarea coduce la o absortie majoritar la nivelul plaminilor, prin mecanism de difuzie si/sau filtrare;

- administarea parenterala coduce la absortia cea mai eficienta, administarea intravenoasa introduce direct substanta in circulatie iar administrarea intramusculara si subcutanata presupune difuzia substantei prin muschi sau tesuturi urmata de intrarea ulterioara in circuitul sanguin;

- administarea la nivelul tegumentelor si mucoaselor, coduce la absortia prin difuzie a substantei.

Din aceste motive in medicina toxicologica este necesar a se tine cont de aceste aspecte atunci cind se recolteaza probe pentru analize. Este unanim acceptat astazi ca majoritatea substantelor pot fi detectate din probe de singe, dar in functie si de perioada de timp care a trecut de la administrarea substantei.

Odata ajunse in singe substantele sunt distribuite spre diverse tesuturi. Procesul de distributie dpinde din nou de tipul substantei, de tipul tesutului, etc. In tabelul 5 este prezentat un exemplu privitor la distributia (procentual) a cocainei si amfetaminei in diverse organe (valori medii).

Tabelul 5. *Probe biologice: distributia cocainei si amfetaminei in singe, diverse organe si urina*

Drog	pKa drog	Singe	Creier	Ficat	Rinichi	Urina
Amfetamina	9,9	9	3	30	17	35
Cocaina	8,6	5	7	5	15	50

Practic, majoritatea substantelor ajung prin singe in ficat, unde fie sunt metabolizate fie sunt excretate ca atare inapoi in singe sau in bila, de unde sunt eliminat prin materii fecale si urina. In principiu, substantele hidrosolubile se elimina in bila si apoi in fecale, pe cind cele liposolubile sunt retrimise in singe si se elimina prin urina.

V.2.2. Fluide biologice

Fluidele biologice sunt practic cele mai utilizate probe in medicina judiciara si de aceea buna lor cunoastere este o sarcina obligatorie pentru toti specialistii in domeniu.

Analiza acestor probe depinde de mai multi factori, dar in general este admis ca cu cit o proba este mai fluida cu atit este mai usor analizata. In tabelul 6 este presentata ordinea descrescatoare a scaderii fluiditatii probelor biologice. Se observa ca cel mai usor de anlizat va fi lichidul cefalorahidian (LCR) si cel mai greu sunt oasele. Singele se afla undeva in a doua jumatate, si de aceea ait cit se poate este de evitat.

***Tabelul 6**. Fluide biologice: ordinea descrescatoare a scaderii fluiditatii*

Lichide	LCR Lacrimi Sudoare Saliva Urina Bila
Amestec	Plasma/ser Singe Materii fecale Inima/ficat/rinichi Plamini/muschi Oase

Singe, plasma, ser

Singele este un fluid cu o compozitie extrem de complexa, fiind, datorita utilitatii si accesibitatii lui, cel mai utilizat tip de proba in medicina judiciara moderna.

Principalii constitenti ai singelui, eritrocitele („singele rosu") si fluidul clar (plasma sau serul), pot fi separati cu usurinta prin centrifugare. In practica

toxicologica este preferata utilizarea plasmei, desi sunt cazuri in care este necesara utilizarea ambelor componente majore ale singelui. Chiar in cazul utilizarii plasmei, deoarece ea contine un amestec complex de proteine si adeseori substantele se leaga de proteine, analiza directa a plasmei nu va da continutul total in substanta. Din acest motiv, adesea proteinele plasmatice se denatureaza inainte de a fi extrase cu un solvent organic.

Urina

Spre deosebire de singe/plasma, urina are un continut mult mai mic de proteine ceea ce o face mult mai usor de analizat (in prealabil se face extractie din urina cu un solvent organic). Desi mult mai usor de analizat, folosirea probelor urinare ridica o serie de probleme, deoarece interpretarea rezultatelor este complicata de mai multi factori cum ar fi: cantitatea de urina, pH-ul acesteia, si timpul care a trecut de la administrarea substantei. Cu toate acestea folosirea probelor de urina este larg folosita in special in cazul tetarilor de medicamente si la determinarea dopingului la sportivi.

Saliva

Folosirea probelor de saliva prezinta avantaje si dezavntaje comparativ cu probele clasice de singe si urina. Probele de saliva se utilizeaza fara a fi nevoie de extractie, pot fi determinate atit substantele cit si metabolitii lor, colectarea lor este mai putin invaziva, degradarea probelor decurge mai greu.

V.2.3. Tesuturi postmortem

Alegerea unui tesut postmortem pentru analiza depinde de tipul de drog/toxic/medicament cautat. Asa spre exemplu, in cazul in care se suspecteaza o moarte datorita unei supradoze de morfinomimetice este recomandata folosirea ca si proba de analizat a bilei, in cazul otravirilor cu cianuri si solventi se prefera probele de creier iar pentru otraviri cu metale grele se prefera probe din rinichi.

Cele mai utilizate tesuturi postmortem pentru analize sunt recoltate din ficat, creier, bila, umoarea vitroasa, singe, continut stomacal precum si muschii si rinichii (mai putin utilizati).

Ficatul si bila

Ficatul este unul din organele preferate in analiza forensica, in special in cazul drogurilor. Fiind un organ vascularizat puternic, concentratia drogurilor este in general egala cu cea din plasma. Unele droguri pot fi gasite ca atare sau sub forma de metaboliti in bila, cazul opiaceelor.

Creierul

In cazul otravirilor cu cianuri si solventi creierul este organul preferat pentru analize. De asemenea, creierul fiind relativ rezistent la putrefactie, este organul preferat in analiza de droguri atunci cind analiza se face la citeva zile dupa moartea persoanei.

Umoarea vitroasa

Ca si in cazul creierului, umoara vitroasa este rezistenta la putrefactie si in consecinta probele sunt mai usor de analizat. Trebuie sa se tina cont ca umoarea vitroasa este slab acida si in consecinta substantele usor bazice se vor gasi in concentratii marite.

Continut stomacal

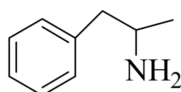
Continutul stomacal da informatii atit asupra tipului de substanta ingerata cit si asupra modului de adminstrare. Preznta de urme sau lipsa unui drog/toxic/medicament indica ca ruta de administrare este alta decit cea orala.

Folosirea probelor de tesuturi postmortem este limitata de o serie de dificultati datorate procesului de putrefactie a celulei. Cele mai importante dificultati sunt:

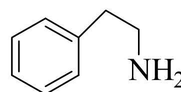
1. Datorita procesului de putrefactie se produc compusi care pot interfera cu substanta (drog/toxic/medicament) de analizat;
2. Exista substante care se descompun in urma procesului de putrefactie;
3. Pretratamentul probelor postmotem poate presupune proceduri mai dure care face ca substanta de analizat sa nu reziste;

4. Substantele si metaolitii pot suferi procese de redistributie in tesuturile postmortem, ceea ce ingreuneaza interpretarea datelor obtinute.

Substantele rezultate in urma procesului de putrefactie pot avea caracter bazic (amine biogene in special), acid (acizi organici inferiori) sau neutru. De exemplu, din categoria substantelor avind caracter bazic rezultate in urma procesului de putrefactie, unul dintre compusii reprezntativi este β–feniletilamina, care pot interfera cu substante din clasa amfetaminelor dind reactii fals pozitive.



Amfetamina



β-Feniletilamina

V.2.4. Probe neconventionale

Sub denumirea de probe neconventionale sunt cunoscute acele probe care sunt utilizate mai rar in medicina judiciara. Aici intra o serie de probe cum ar fi parul, unghiile, oase, o serie de fluide biologice cum ar fi probe de transpiratie, saliva, lichid seminal. Desi extrem de utile, informatiile furnizate din analiza acestor probe pierd mult din valoare datorita faptului ca inca nu exista o standardizare unanim acceptata a metodelor lor de analiza. Dintre aceste tipuri de proba, parul este de departe proba judiciara cea mai utilizata.

Parul

Astazi, GC / MS-ul este deja metoda preferata de analiza a probelor de par, tinzind sa devina una de rutina. Exlicatiia utilizarii pe scara din ce in ce mai larga a firelor de par ca probe in medicina judiciara, consta in avantajele pe care le prezinta: practic toate tipurile de drog/toxic se acumuleaza in par si pot fi detectate ca atare (nu ca metaboliti sau produsi de degradare), perioada de remanenta a

drogului in par este mare (saptamini sau chiar luni), probele de par sunt se recolteaza si se pastreaza usor, etc. In Tabelul 7 sunt prezentate sintetic avntajele si dezavantajele utilizarii probelor de urina si par.

***Tabelul** 7.* Avntajele si dezavantajele utilizarii probelor de urina si par

	Urina	Par
Drog	Toate (cu exceptia unor steroizi)	Toate (cu exceptia hormonilor)
Compus majoritar	Metaboliti	Drogul parinte
Perioada de detectie	2-5 zile	Saptamini, luni
Grad de invazivitate	Ridicat	Mic
Pastrare probe	20 ^{o}C	Temperatura camerei
Risc de alterare a probei	Mare	Mic

Cu toate avantaje incontenstabile pe care le prezinta utilizarea parului in medicina judiciara, utilizarea lui este inca limitata datorita unor neajunsuri:

- nu se cunosc cu exactitate procesele biochimice de absortie si metabolizare a drogurilor in par;
- influenta contaminantilor externi. In prezent este admis ca drogurile/toxicele pot intraS in par pe doua cai: incorporarea in procesul de crestere (din singe) si adsorbtie din mediul extern (secretiile din transpiratie si seebum, expunerea la aerosoli, fum, etc);
- procedurile de colectare pentru analiza firului de par nu au fost standardizate. In majoritatea studiilor publicate, probele sunt obtinute din puncte aleatorii de pe scalp, cel mai adesea din zona de la partea din spate a capului, numit vertex posterior .

V.3. Pregatirea probelor

Pregatirea probelor reprezinta o etapa de importantă cruciala in analiza GC/MS. Pregatirea probelor este o operatiune complexa care necesita din partea specialistului care efetueaza aceasta operatiune cunostinte avansate de separatologie, si in special o temeinica stapinire a operatiilor/metodelor de baza privind izolarea si purificarea compusilor organici. Doua dintre aceste metode sunt indispensabile pentru specialistii in medicina judiciara: extractia si cromatografia.

V.3.1. Extractia si cromatografia in strat subtire

Pregatirea probelor pentru analizele medicolegale GC-MS (si nu numai) presupune cunoasterea notiunilor fundamentale privitoare la extractie si cromatografie, ca metode de baza pentru izolarea si purificarea compusilor.

V.3.1.1. Extracția

Extracția este una din operațiile de bază ale practicii chimiei organice fiind una din principalele metode de separare şi purificare a substanțelor organice. Extracția este operația prin care unul sau mai mulți componenți ai unei faze (lichide sau solide) sunt transferați într-o altă fază (lichidă), nemiscibilă sau parțial miscibilă, adusă în contact cu prima.

În funcție de starea de agregare a produsului din care se face extracția, se deosebeşte:

1. extracția solid – lichid (elutriere);
2. extracția lichid – lichid;
3. extracția gaz – lichid.

Repartiția unei substanțe dizolvate în doua faze este dată de legea de distribuție a lui Nernst ce constă în raportul concentrațiilor la echilibru a substanței în cele două faze lichide (A şi B) nemiscibile ce este constantă la o temperatură dată.

$\frac{C_A}{C_B} = K$, unde K – coeficient de repartiție.

Însă, legea lui Nernst nu este valabilă la concentrații mari ci numai la concentrații mici (comportare ideală) în care substanța dizolvată în ambele faze formează asocieri identice.

Extracția unei substanțe se realizează cu succes atunci când substanța de separat este mult mai solubilă într-una din faze decât în cealaltă, adică K diferă mult de valoarea 1. Astfel atunci când $K<100$ o singură extracție nu mai poate fi eficientă şi trebuie repetată de mai multe ori cu o soluție proaspătă.

În cazul în care avem de-a face cu două substanțe ai căror coeficienți de repartiție (K_1 şi K_2) sunt net diferiți, atunci separarea se realizează printr-o extracție simplă.

$$\beta = \frac{K_1}{K_2}$$

Atunci când $\beta \geq 100$ substanțele se pot separa mulțumitor dintr-o singură extracție, iar când $\beta \leq 100$ se apelează la un procedeu multiplicativ. Deoarece, schimbul de substanță se realizează numai la interfața de separație a celor două faze, pentru a mări viteza de repartiție este necesară o agitare energică şi o interfață cât mai mare. Din păcate, în majoritatea cazurilor (în special în cazul substanțelor solide) echilibrul de repartiție nu poate fi atins în totalitate.

Extracția solid – lichid

Extracția solid-lichid urmăreşte separarea unei substanțe organice într-un anumit solvent în care componentul este solubil. Un solvent bun pentru extracție

trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- să solubilizeze cu uşurință substanța de extras;
- să fie selectiv;
- să nu reacționeze cu substanța de separat;
- să asigure o îndepărtare facilă după extracție;
- să fie ieftin şi disponibil comercial.

Se cunosc diverse procedee de extracție a solidelor cu solvenți. Extracția din substanțe solide cu ajutorul solvenților se realizează cu ajutorul mai multor tipuri de operații:

Macerarea şi digerarea

<u>Macerarea</u> este cel mai simplu procedeu de extracție ce constă în amestecarea fazei solide cu solventul urmată de filtrarea soluției obținute. Acest procedeu necesită o dispersare cât mai accentuată a substanței solide prin adăugare repetată de solvent şi agitare continuă.

<u>Digerarea</u> este de fapt macerarea la cald.

Ambele operații pot fi realizate cu uşurință deoarece nu necesită aparatură complicată, având nevoie doar de un pahar Berzelius în care se face extracția şi pâlnie Büchner şi flacon Erlenmeyer de vid pentru realizarea filtrării.

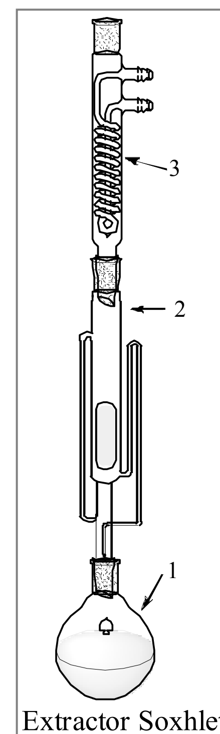
Cele două procedee sunt des folosite în extracția substanțelor organice din plante sau organele animale.

<u>Procedeul Soxhlet</u>

Pe scară largă se aplică extracția continuă în aparatură specială (extractoare Soxhlet) în care, de obicei, solventul proaspăt este furnizat prin fierberea extractului.

Extractorul Soxhlet se compune dintr-un balon (**1**), un corp de extracție (**2**) şi un refrigerent ascendent (**3**), legate între ele.

Materialul solid, mărunțit în prealabil pentru ca solventul



Extractor Soxhlet

să vină în contact cu o suprafaţă cât mai mare, se aşează în spaţiul de extracţie, fie introdus într-un cartuş special de hârtie de filtru, fie vărsat direct în spaţiul de extracţie prevăzut cu un fund de sticlă poroasă. Faza extractoare (solventul) din balonul de fierbere distilă printr-un tub lateral, prevăzut eventual cu o izolaţie termica, iar vaporii condensaţi în refrigerentul de reflux picură peste materialul din cartuş. Când spaţiul de extracţie se umple până la înălţimea stratului de preaplin, soluţia cu extract trece prin sifonare în balonul de fierbere şi procesul se repetă.

Uneori sunt suficiente câteva ore pentru extracţia completă, însă la substanţele care trec mai greu în soluţie sunt necesare chiar câteva zile.

La unele aparate Soxhlet, de construcţie imperfectă, se întâmplă ca, după umplerea tubului de preaplin, soluţia cu extract să nu se scurgă dintr-o dată, ci numai în picături, în ritmul în care picură dizolvantul din refrigerentul de reflux. Acelaşi defect apare şi atunci când cartuşul de extracţie este greu permeabil, sau dacă este lipit de gura sifonului. Acest defect înrăutăţeşte extracţia. El se poate înlătura suflând în refrigerent.

Principalii factori care influenţează o extracţie solid – lichid sunt:

- solubilitatea solidului în solvent;
- viteza de transfer a solidului în fază lichidă.

Solubilitatea solidului în solvent poate fi influenţată din exterior prin alegerea unor solvenţi adecvaţi.

Viteza de transfer a solidului în faza lichidă depinde de mai multe fenomene şi mărimi fizice, ca de exemplu mărimea granulelor solidului, sistemul cristalin, viteza de pătrundere a solventului în solid, difuzia substanţei solide în lichid, etc.

Extracţiile uzuale de laborator vizează influenţarea, în sens favorabil, a trecerii solidului în solvent, de exemplu prin mărirea suprafeţei solide, prin extracţie continuă cu solvent proaspăt, prin agitare viguroasă. Ridicarea temperaturii măreşte atât solubilitatea compusului (fenomen termodinamic), cât şi viteza sa de transfer în faza lichidă (fenomen cinetic).

Extracţia alcaloizilor din frunze, a substanţelor aromate din seminţe, a esenţelor de parfum din flori, a zahărului din trestia de zahăr se constituie drept

exemple de extracții solid – lichid, utilizate în industria chimică organică pentru separarea şi izolarea substanțelor din amestecuri naturale.

Solvenții utilizați în mod frecvent sunt: CH_2Cl_2, $CHCl_3$, CS_2, CH_3COCH_3, alcooli, apa.

Extracția lichid – lichid

Extracția lichid-lichid operația este cea mai des aplicată, în laborator şi industrie, în scopul separării şi concentrării unor componenți din faza inițială, unde aceştia se aflau alături de impurități. Această operație are la bază diferența de solubilitate a componentului extras în unul sau mai mulți solvenți nemiscibili sau parțial miscibili între ei.

Faza care conține inițial componenții interesați se numeşte *fază de extras*, iar faza cu care aceasta se aduce în contact poartă numele de *fază extractoare* sau *solvent*. La terminarea extracției, faza care a preluat componenții se numeşte *extract* iar faza rămasă *rafinat*.

Alegerea unui solvent bun pentru extracție, nu se face întâmplător, impunându-se următoarele condiții:

- să solubilizeze foarte bine substanța de extras;
- să fie, pe cât posibil, nemiscibil cu solventul din care substanța trebuie extrasă;
- să extragă cât mai puține impurități;
- să fie uşor de eliminat după terminarea extracției;
- să nu reacționeze cu substanța ce trebuie extrasă;
- să fie accesibil şi la un preț de cost cât mai redus.

Echilibre de repartiție. Coeficient de repartiție

Se consideră un compus de extras A ce este solubil în doi solvenți nemiscibili sau parțial miscibili între ei. Într-o primă etapă peste soluția inițială a compusului A se adaugă cel de-al doilea solvent curat şi astfel moleculele compusului de extras A

vor străbate suprafața de separație, trecând în cel de-al doilea solvent. Pe măsură ce concentrația de A în cel de-al doilea solvent crește, începe și procesul invers de trecere a moleculelor de A înapoi în primul solvent. După un timp viteza celor două procese este egală, compoziția în cele două faze rămânând constantă, și astfel se stabilește un *echilibru dinamic de repartiție* atunci când compusul de extras A se găsește distribuit în anumite proporții în ambii solvenți.

Prescurtările uzuale, cele mai des întâlnite, sunt următoarele:

R – rafinat; S – extract; C_R – Concentrația componentului A în stratul R; C_S – Concentrația componentului A în stratul S;

Coeficientul de repartiție K reprezintă raportul dintre concentrația C_S a componentului A în stratul S și concentrația C_R a componentului A în stratul R.

$$K = \frac{C_S}{C_R}$$

În condițiile în care considerăm A_S și A_R ca fiind cantitățile absolute de component A dizolvate în cei doi solvenți, iar V_S și V_R volumele solvenților respectivi, atunci concentrațiile C_S și C_R se pot exprima astfel:

$C_S = \frac{A_S}{V_S}$ și respectiv $C_R = \frac{A_R}{V_R}$

Și în aceste condiții coeficientul de repartiție K va lua următoarea formă:

$$K = \frac{\frac{A_S}{V_S}}{\frac{A_R}{V_R}} = \frac{A_S \cdot V_R}{A_R \cdot V_S}$$

Deoarece coeficientul de repartiție K nu indică mărimea cantităților de component A distribuite în cei doi solvenți, întrucât acestea depind și de volumele de solvent, prin rearanjarea relației de mai sus se obține:

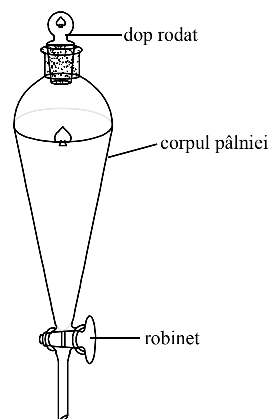
$\frac{A_S}{A_R} = K \cdot \frac{V_S}{V_R} = G$, unde G este cifra de repartiție.

În calcule, cantitățile absolute A_S și A_R sunt înlocuite cu cantitățile relative p și q, cu remarca că p+q = 1:

$$p = \frac{A_S}{A_{total}} = \frac{G}{G+1}; \quad q = \frac{A_R}{A_{total}} = \frac{1}{G+1}$$

Extracția lichid-lichid în laborator

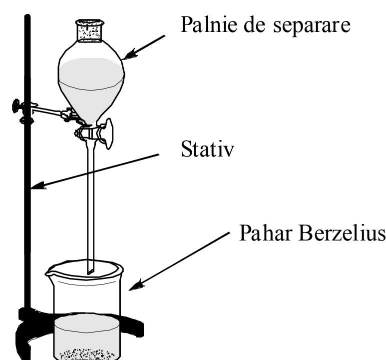
Pentru o extracție cât mai eficientă se recomandă se recomandă efectuarea mai multor extracții succesive cu porțiuni mici din cantitatea totală de solvent de extracție.



În laboratoare extracțiile se efectuează prin agitarea soluției cu solventul de extracție în pâlnii de separare, care datorită formei specifice oferă o suprafață de separație mare se fac prin agitarea soluției cu solventul de extracție.

Este recomandat ca umplerea cu lichid a pâlniei de separare să nu se facă mai mult de ¾ din volumul său. Pentru o extracție eficientă este necesară asigurarea unui contact optim între cele două faze este necesară agitarea intensă a pâlniei timp de 3-5 minute, după care aceasta se lasă în repaus până la separarea completă a celor două faze. În cazul apariției de emulsii nu mai este recomandată agitarea, ci în acest caz este suficientă efectuarea unor mişcări circulare în plan orizontal.

Din timp în timp este necesară efectuarea aerisirii, prin inversarea poziției pâlniei şi deschiderea temporară a robinetului. Această operație este absolut necesară mai ales în cazul solvenților extrem de volatili (eter etilic, eter de petrol etc.).



După separarea completă a celor două faze, se scoate dopul de la partea superioară a pâlniei şi faza inferioară este separată cu grijă într-un flacon Erlenmeyer sau Berzelius. Chiar dacă numai una din faze prezintă interes, după terminarea separării

vor fi păstrate ambele faze până când avem dovezi certe că substanța vizată se găseşte acolo unde trebuie.

Faza apoasă poate fi uşor deosebită de faza organică nemiscibilă pe baza densităților celor două faze (faza cu densitatea cea mai mare va constitui faza inferioară), sau şi mai simplu prin efectuarea unui simplu test de laborator, prin adăugarea câtorva mililitri de apă într-o eprubetă şi colectarea câtorva picături din faza inferioară, astfel faza apoasă va forma o soluție omogenă , iar faza organică un sistem bifazic.

Atunci când limita de separaţie dintre cele două faze se apropie de robinet, se reduce mult viteza de separaţie.

La final, pentru a se evita o eventuală impurificare, faza superioară se toarnă prin gura pâlniei într-un alt flacon, faza organică se usucă utilizând un agent de deshidratare convenabil (Na_2SO_4 anh., $CaCl_2$ anh., $MgSO_4$ anh. etc.), iar ulterior se îndepărtează solventul prin distilare.

V.3.1.2. Cromatografia in strat subtire - metode cromatografice

Cromatografia este o metodă de separare şi purificare a substanțelor organice, introdusă relativ recent în practica de laborator. Denumirea de cromatografie a fost dată de botanistul rus Țvet şi în limba rusă înseamnă culoare. Țvet a aplicat această metodă la separarea coloranților vegetali (clorofile, carotinoide) printr-o coloană cu carbonat de calciu.

Cromatografia se bazează pe repartiția diferită a moleculelor între o fază staționară şi o fază mobilă. În funcție de afinitatea față de faza staționară şi cea mobilă, diferitele specii moleculare ale unui amestec sunt antrenate cu viteze diferite, prin deplasarea fazei mobile, realizându-se astfel separarea lor.

În funcție de natura solidă, lichidă sau gazoasă a acestor faze, au fost dezvoltate mai multe tehnici cromatografice. Dintre acestea cele mai utilizate de chimistul organician sunt:

1. Cromatografia în strat subțire (*Thin layer chromatography, TLC*);

2. Cromatografia solid-lichid pe coloană (*Liquid column chromatography, LC*);
3. Cromatografia gaz-lichid (*Gas liquid chromatography, GLC sau GC*);
4. Cromatografia lichidă de înaltă performanță (*High performance liquid chromatography, HPLC*)

1. Cromatografia în strat subțire

Primele încercări în acest domeniu datează din anul 1938 şi aparțin lui Izmailov şi Schraiber, iar prima carte a fost publicată în 1962 de către Stahl. Deşi intrată relativ târziu în practica de laborator, cromatografia în strat subțire s-a dezvoltat foarte rapid. Astfel într-un timp foarte scurt ea s-a impus ca o extrem de utilă atât în cercetare cât şi în producție.

Ca principiu şi ca tehnică, cromatografia în strat subțire se aseamănă foarte mult cu cromatografia pe coloană. În acest caz, faza staționară este un adsorbant (silicagel, alumină) dispus pe un suport plan din sticlă sau metal, iar faza mobilă circulă de obicei prin capilaritate.

Cromatografia în strat subțire este o metodă utilă, utilitatea acesteia rezidă din următoarele avantaje:

- Permite separări pentru cantități foarte mici de substanță (0,01 μg);
- Este o metodă accesibilă şi uşor de realizat;
- Se efectuează într-un timp scurt;
- Permite separarea substanțelor instabile;
- Permite analiza simultană a mai multor probe;
- Permite analiza stadiului unei reacții chimice;
- Direct pe placa cromatografică se pot efectua reacții chimice, cum ar fi: oxidări, reduceri, deshidratări, etc.

Tehnica generală a cromatografiei în stat subțire

Această tehnică a fost pusă la punct de Stahl şi constă în obținerea unui strat

de adsorbant (silicagel, oxid de aluminiu) de aproximativ 250 μm grosime pe o placă de aluminiu sau sticlă de dimensiuni variabile.

Numărul adsorbanților folosiți ca fază staționară este relativ redus. Adsorbanții se pot clasifica în adsorbanți anorganici şi adsorbanți organici. Dintre aceştia, adsorbanții anorganici sunt cel mai des folosiți deoarece sunt adsorbanți puternici comparativ cu adsorbanții organici ce sunt în general adsorbanți slabi.

Adsorbantul trebuie să aibă o suprafață specifică mare, respectiv o granulație fină, (sub 100 μm) şi număr mare de pori pe diametru mic.

Pregătirea plăcuțelor

Într-un flacon Erlenmeyer de 200 ml se introduc 25 g silicagel G (cu gips) peste care se adaugă o soluție formată din 50 ml apă şi 0,5 g amidon. Se agită flaconul 1-2 minute şi apoi conținutul se toarnă pe o placă din sticlă de mărime 20/20 cm şi se omogenizează cât mai bine prin mişcări de translație (balansare), iar la sfârşit se poate da şi cu o baghetă din sticlă pentru o omogenizare mai bună. Se lasă placa să se usuce 24 ore la temperatura camerei şi apoi se usucă timp de 30 minute în etuvă la temperatura de 105 - 110°C. Se lasă apoi la răcit şi se utilizează cât mai repede.

Modul de lucru:

Pentru realizarea cromatografiei în strat subțire trebuiesc parcurse următoarele etape:

a) Se trasează cu creionul linia de start pe care ulterior va fi aplicată substanța. Linia de start se trasează la aproximativ 1 cm de capătul inferior al plăcuței cromatografice.
b) Se taie placuța cromatografică în funcție de numărul de probe ce urmează a fi aplicate.
c) Se taie cu foarfecele colțurile colțurile plăcuței la un unghi de aproximativ 45^{o}, pentru ca migrarea solventului sa fie uniformă în linie dreaptă.

d) Amestecul de substanță de analizat se dizolva într-un solvent cât mai nepolar şi uşor volatil. Folosirea solvenților volatili prezintă un dublu avantaj: pe de o parte evită efectele nedorite de difuzie şi pe de altă parte permite creşterea concentrației substanței în punctul de aplicare, datorită evaporării rapide a solventului.

e) Aplicarea substanței pe plăcuța cromatografică se realizează cu ajutorul tuburilor capilare pentru a se realiza concentrarea substanței pe o suprafață minimă. În toate cazurile, indiferent de solventul folosit, este necesară îndepărtarea completă a dizolvantului înainte de începerea eluției.

Eluenți folosiți

Deoarece viteza de migrare a unei substanțe pe un adsorbant cât şi rezoluția separării depind de eluentul sau amestecul de eluenți folosiți, acesta trebuie să îndeplinească mai multe condiții:

- Să permită oținerea valorilor R_f ale componentelor de separat între 0,05 şi 0,9;
- Să separe complet toate componentele din amestec;
- Să nu producă transformări chimice ale substanțelor de separat;
- Nu trebuie să reacționeze cu reactivii de identificare.

In tabelul 8 sunt prezentate citeva amestecuri eluotrope mai des utilizate in cromatografie.

Tabelul 8. *Amestecuri uzuale de solvenți pentru cromatografie*

Hexan	Cloroform – metanol = 95:5
Hexan – clorură de metilen =5:2	Cloroform – acetonă = 7:3
Benzen	Benzen – acetat de etil = 1:1
Benzen – cloroform = 1:1	Acetat de butil – metanol = 99:1
Cloroform	Benzen – eter = 1:9
Ciclohexan – acetat de etil = 8:2	Eter – metanol = 99:1

Cloroform – acetonă = 95:5	Eter
Benzen – acetonă = 9:1	Eter – dimetil formamida = 99:1
Ciclohexan – acetat de etil = 1:1	Acetat de etil
Ciclohexan – ester pentru testări = 8:2	Acetat de etil – metanol = 99:1
Benzen – acetonă = 8:2	Benzen – acetonă = 1:1
Cloroform – metanol = 9:1	Cloroform – metanol = 9:1
Cloroform – acetonă = 4:6	Dioxan
Benzen – acetat de etil = 1:1	Acetonă
Cloroform – eter = 6:4	Metanol
Acetat de butil	Dioxan – apă = 9:1

Developarea

După ce a fost pregătită plăcuța cromatografică, aceasta se introduce în cuva cromatografică (de forma paralelipipedică sau cilindrică). Plăcuța cromatografică se imersează în cuva cu eluent cu capătul la care s-au aplicat probele, iar cuva se acoperă pentru a asigura în interiorul cuvei o atmosferă saturată în vapori de eluent. Este recomandat ca stratul adsorbant să fie imersat cât mai puțin posibil (3-4 mm, astfel încât eluentul să nu depăşescă linia de start).

Oprirea developării se realizează atunci când frontul solventului ajunge la aproximativ 1 cm de marginea superioară a plăcuța cromatografice. Se scoate placuța cromatografică din cuvă şi se marchează cu un creion frontul solventului (linia pâna la care a urcat solventul pe plăcuță). Plăcuța cromatografică se usucă după developare în curent de aer liber sau în curent de aer cald (feon), în funcție de volatilitatea eluentului.

Identificarea compuşilor după developare

Cel mai simplu caz este cel al compuşilor colorați, care se observă direct pe cromatogramă, însă se întâlnesc situații în care compuşii, pentru a putea fi vizualizați, trebuie expuşi radiației ultraviolete (UV).

Există şi compuşi care trebuiesc scoşi în evidenţă prin reacţii de culoare specifice grupărilor funcţionale. În această situaţie pe cromatogramă se aplică reactivii de culoare, fie prin pulverizare, fie prin imersia plăcuţei cromatografice în soluţia acestora. După uscare se observă diferite spoturi, corespunzătoare componentelor din amestecul de analizat.

Determinarea valorilor R_f

Poziţia unui spot pe plăcuţa cromatografică se exprimă printr-o mărime ce caracterizează substanţa, şi o diferenţiază de celelalte, mărime numită factor de viteză (Rf) şi care se defineşte ca raportul dintre distanţa parcursă de spotul substanţei şi distanţa parcursă de developant (vezi **Figura V.3.1.**).

$R_f = X_S / X_D \qquad 0 \leq R_f \leq 1$

Unde: X_S – reprezintă distanţa parcursă de la zona de start până la punctul unde ea se găseşte în momentul opririi developării.

X_D – reprezintă distanţa parcursă de la zona de start, de frontul developantului în acelaşi interval de timp.

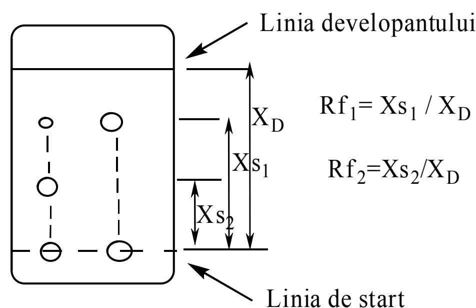


Figura V.3.1. Separarea izomerilor geometrici prin cromatografie în strat subţire

2. Cromatografia solid-lichid

Mecanismul de separare a substanţelor

Se bazează pe repartiția diferită a componenților unui amestec între o fază staționară (solid adsorbant sau lichid depus pe suprafața unui adsorbant) şi o fază mobilă (lichid, eluent).

Faza mobilă străbate faza staționară, iar astfel componenții amestecului de separat vor fi repartizați diferit în funcție de viteza lor de migrare. Cu cât componentul este mai puțin adsorbit pe faza staționară cu atât viteza de migrare este mai apropiată de cea a fazei mobile, iar cu cât componentul va fi mai puternic adsorbit pe suprafața fazei staționare cu atât moleculele sale vor sta un timp mai îndelungat imobile.

Afinitatea diferită a componentelor dintr-un amestec față de faza staționară diferă în funcție de capacitatea de adsorbție a fazei solide. Substanța solidă care adsoarbe se numeşte adsorbant. Astfel, se deosebesc adsorbanți polari şi nepolari:

- adsorbanți nepolari: cărbune activ, anumite răşini organice (de exemplu wofatit EW);
- adsorbanți polari: oxid de fier (Fe_2O_3), oxid de aluminiu (Al_2O_3), silicagel, hidrați de carbon (amidon, zahăr, celuloză).

Dintre aceşti adsorbanți o importanță deosebită o au cei polari. Adsorbanții polari au afinitate mare față de componentele polare din amestec, acestea fiind puternic adsorbite pe suportul solid, iar componentele nepolare sunt antrenate foarte uşor de faza mobilă.

Pe lângă polaritate, adsorbabilitatea substanțelor organice depinde şi de mărimea moleculelor şi polarizabilitatea lor. Astfel se pot ordona substanțele organice în ordinea crescătoare a afinității lor față de adsorbanții polari: derivați halogenați ai hidrocarburilor < eteri < amine terțiare, nitroderivați < esteri < cetone, aldehide < amine primare < amide acide < alcooli < acizi carboxilici.

Aceleaşi considerații sunt valabile şi pentru solvenți adică o substanță organică se adsoarbe mai puternic dintr-un solvent nepolar decât dintr-unul polar. Astfel substanța adsorbită va fi dezlocuită de moleculele de solvent, dacă acestea au afinitate mai mare față de adsorbant decât de substanță.

Pentru o selecţie cat mai uşoară au fost stabilite serii eluotrope, corespunzător cu creşterea polarităţii (Tabelul 9).

Tabelul 9. *Seria eluotropă*

1) eter de petrol	11) tetrahidrofuran
2) hexan, ciclohexan	12) acetat de etil
3) sulfură de carbon	13) acetonă
4) tetraclorură de carbon	14) metiletilcetonă
5) dicloretilenă	15) *n*-butanol
6) toluen	16) etanol
7) benzen	17) metanol
8) clorură de metilen	18) apă
9) cloroform	19) acid acetic glacial
10) eter etilic	20) piridină

Condiţia principală impusă solvenţilor este anhidritatea completă, deoarece urmele de apă reduc semnificativ calităţile de adsorbţie ale fazei staţionare.

V.3.2. Pretratamentul si prepararea probelor

Conversia analititilor din probele de studiat in forma necesara analizei este cunoscuta in literatura de specialitate ca si operatiunea de pretratament. Este o oprerатiune dificila si laborioasa in special datorita faptului ca drogul/toxicul se gaseste aproape intodeauna impreuna in amestec cu alte substante, in asa zise matrici. In cazul compusilor de sinteza drogul/toxicul se gaseste combinat cu diversi excipienti si/sau substante falsificate, iar pentru compusii naturali din plante cu alte substante din planta. In plus, in plante cantitatea de drog/toxic este foarte mica, in cele mai multe cazuri sub 1% din masa plantei.

In cazul probelor biologice (singe, urina, etc) drogul/toxicul se gaseste fie sub forma conjugata (ex. glucuronoconjugat) fie ca metabolit, si doar foarte rar ca atare. In plus, ca si la plante, cantiatea de drog/toxic din probe biologice este - este mica. Din aceste motive, in cazul probelor biologice, de obicei, sunt necesari mai multi pasi in pregatirea probelor:

- se realizeaza intii scindarea substantei din conjugat. Aceasta se realizeaza prin hidroliza acida (metoda este rapida), enzimatica (metoda este lenta) si foarte rar bazica (posibila doar ca conjugatii de tip esteric);
- urmeaza apoi izolarea. Aceasta se face fie prin extractie, fie cromatografic, fie, foarte rar, prin cristalizare. Date pe larg despre aceste aspecte au fost prezentate anterior la V.3.1. ;
- in unele cazuri este necesara o etapa suplimentara denumita derivatizare. Mai precis atunci cind compusii sunt polari (compusi contin grupari carboxilice, hidroxilice, tiolice, amino primare si secundare, etc.) sau au o grupa puternic electronegativa (ex. $-CF_3$; halogen, etc), derivatizarea se impune cu necesitate. Principalele procedee de derivatizare sunt :

a. Pentru droguri/toxice avind caracter bazic: acetilarea, trifluoroacetilarea, pentafluoropropionilarea, heptafluorobutirilarea, trimetilsililarea;
b. Pentru droguri/toxice avind caracter acid: metilare, pentafluoropropionilarea, trimetilsililarea, *tert*-butildimetilsililare.

Asupra derivatizarii vom reveni pe larg in capitolul urmator.

Referitor la extractia drogurilor/toxicelor din probe, mai trebuie precizat ca uneori este necesara modificarea pH-ului probei astfel incit sa se realizeze trecerea drogului in faza organica. pH-ul necesar se poate calcula cu ajutorul ecuatiei Henderson-Hasselbach:

$$pH = pKa + \log ([A^-]/[HA])$$

unde: pH- este pH-ul solutiei analizate;

pKa- este pKa-ul drogului/toxicului;

A^- - este forma bazica (ionizata) a drogului/toxicului;

HA – este forma acida (neionizata) a drogului/toxicului.

Cunoscind pKa-ul drogului/toxicului si valoarea pe care o dorim pentru concentratia drogului/toxicului in forma neionizata (HA), se poate calcula cu usurinta pH-ul optim pentru trecerea in faza organica.

Prezentam mai jos (Tabele 10, 11) citeva sisteme extractive mai des utilizate pentru droguri si pentru si pentru extractii din materii prime vegetale (plante).

***Tabelul 10**. Sisteme extractive pentru droguri, in mediu acid sau bazic*

Drogul extras	Sistem extractiv folosit
Morfina; hydromorfona; pentazocina; cocaina	NH_4OH-saturat/cloroform
Amfetamina; metamfetamina; 3,4-metilen-dimetoxiamfetamina; meperidida; efedrida	NH_4OH-saturat/hexan
Heroína; cocaina; pentazocina; meperidina; penciclidina	HCl-saturat/cloroform
Cocaina	NH_4OH-saturat/eter de petrol

***Tabelul 11**. Sisteme extractive pentru izolarea drogurilor din materii prime vegetale*

Material din plante	Drog	Solventul si procedeul de extractie
Canabis	Canabioide	Cloroform (temperatura camerei); Eter petrol (temperatura camerei); Etanol (Soxhelet)
Frunze coca	Cocaina	Cloroform/eter de petrol/metanol (2:1:1) (temperatura camerei)
Opiu	Morfina	Metanol (reflux); Sonicare in prezenta acid acetic 5%, apoi extractie cu cloroform/metanol (3:1) la pH 8,5

V.3.3. Derivatizarea chimica in medicina judiciara

Derivatizarea se defineste ca fiind procesul de conversie a unui analit dintr-o

proba de studiat in o forma diferita a sa, care poate fi analizata prin diverse metode fizico-chimice.

Ideal, in medicina judiciara, analitii din probe trebuie testati in forma lor originala intrucit aceasta permite identificarea calitativa si cantitativa fara nici un dubiu. Din nefericire, in multe cazuri, acest lucru nu este posibil si este necesar procesul de derivatizare chimica; ea este folosita pe scara larga in medicina judiciara, deoarece exista compusi (in special cei cu polaritate mare) ce nu pot fi analizati prin GC-MS in starea lor originala. Derivatizarea poseda o serie de avantaje si dezavantaje, de care trebuie sa se tina cont. Dintre dezavantaje citam: presupune o reactie suplimentara care poate introduce impuritati sau transformari secundare, costuri suplimentare in bani si timp. Insa, avantajele derivatizarii substantelor sunt incontestabile:

- imbunatatirea unora din proprietatile fizice;
- imbunatatirea proprietatilor cromatografice, in special a capacitatii de separare;
- imbunatatirea capacitatii de detectie prin spectrometrie de masa.

V.3.3.1. Reactii chimice utilizate in procesul de derivatizare

In principiu atunci cind se efectueaza o derivatizare se are in vedere ca reactia chimica utilizata sa fie cit mai simpla, rapida, sa nu dea produsi secundari, sa decurga cu randamente mari in produsul final si sa nu necesite purificari costisitoare ale acestuia.

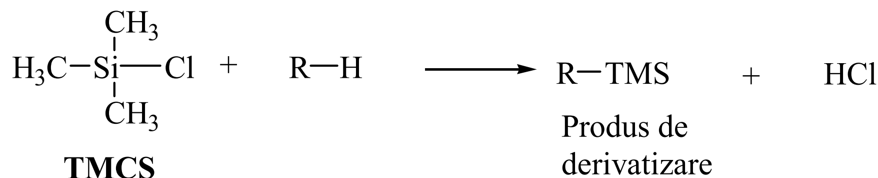
Cele mai utilizate reactii chimice utilizate in procesul de derivatizare sunt alchilarea, acilarea si sililarea.

1. Sililarea

Sililarea este cel mai utilizat procedeu de derivatizare. Cei mai utilizati reactanti de derivatizare sunt:

*a. Trimetilclorosilan **(TMSC)***

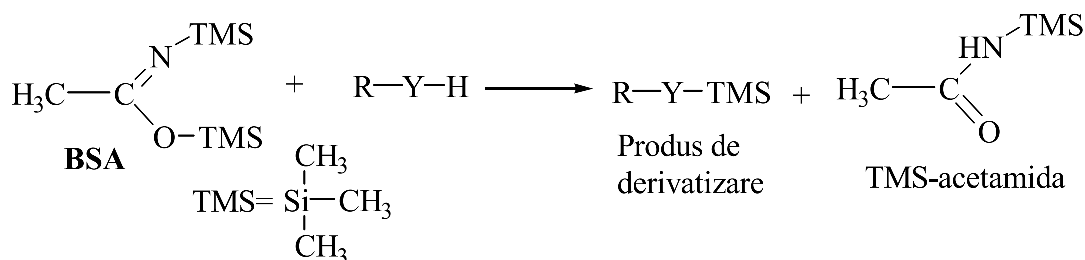
TMCS este folosit ca agent de derivatizare pentru compusi de tipul R-H, unde R este un radical organic. Reactia de derivatizare poate fi reprezentata shematic astfel:



Reactia este mai rar utilizata in prezent, fiind destul de nespecifica. Se observa ca in acest caz ca si produs secundar se obtine acidul clorhiric, care se poate elimina usor prin adaugarea unei baze slabe (trietilamina sau piridina, de obicei).

b. N-O-Bis(trimetilsilil) acetamida ***(BSA)***

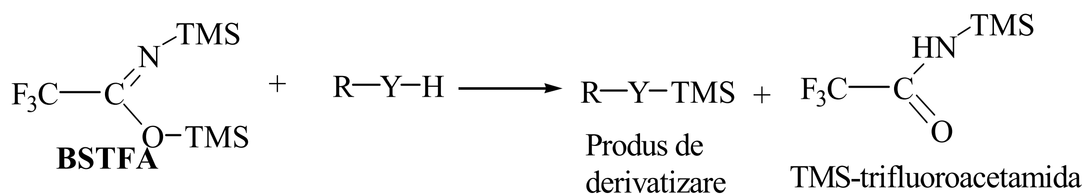
BSA este folosit ca agent de derivatizare pentru compusi de tipul R-Y-H, unde: Y este un heteroatom (altul decit carbon) iar R este un radical organic. Reactia de derivatizare poate fi reprezentata shematic astfel:



Produsul de derivatizare rezultat este stabil, iar conditiile de reactie sunt blinde. Se observa ca in acest caz ca si produs secundar se obtine TMS-acetamida, care poate fi indepartata usor din mediul de reactie.

c. N-O-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida ***(BSTFA)***

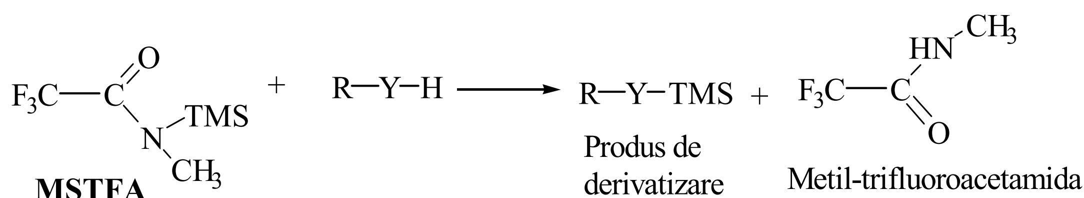
BSTFA este folosit ca agent de derivatizare tot pentru compusi de tipul R-Y-H, avid avantajul ca reactioneaza mai rapid si practic cantitativ. Reactia de derivatizare poate fi reprezentata shematic astfel:



Se observa ca in acest caz ca si produs secundar se obtine TMS-trifluoroacetamida, care poate fi indepartata usor din mediul de reactie.

*d. N-Metiltrimetilsilil trifluoroacetamida **(MSTFA)***

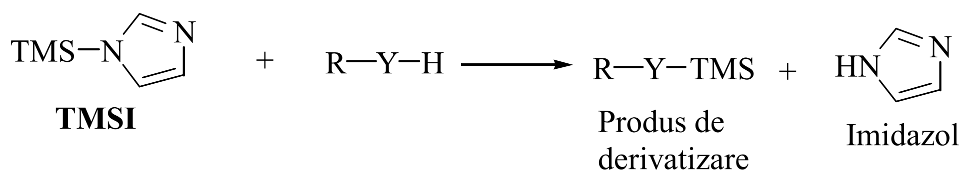
MSTFA este folosit ca agent de derivatizare tot pentru compusi de tipul R-Y-H, putind fi utilizat inclusiv pentru compusii mai volatili. Reactia de derivatizare poate fi reprezentata shematic astfel:



Se observa ca in acest caz ca si produs secundar se obtine metil-trifluoroacetamida, care este voatila si poate fi indepartata usor din mediul de reactie.

*e. Trimetilsililimidazol **(TMSI)***

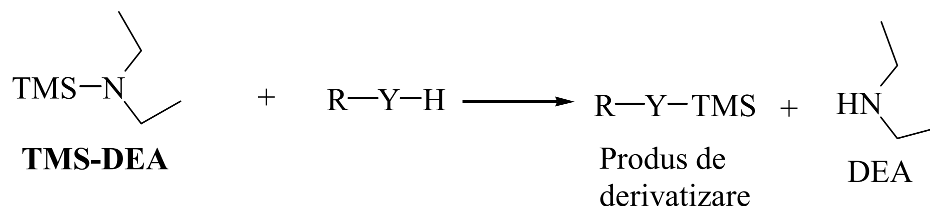
TMSI este folosit ca agent de derivatizare tot pentru compusi de tipul R-Y-H, in special pentru cei cu hidroxil, inclusiv impiedecat steric (nar nu pentru amino). Reactia de derivatizare poate fi reprezentata shematic astfel:



Se observa ca in acest caz ca si produs secundar se obtine imidazolul, care este netoxic si se poate indepartata usor din mediul de reactie.

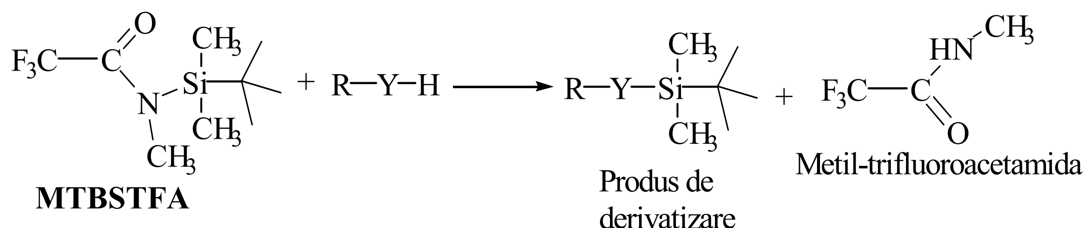
*f. Trimetilsilildietilamina (**TMS-DEA**)*

TMS-DEA este folosit ca agent de derivatizare tot pentru amine si acizi carboxilici. Reactia de derivatizare poate fi reprezentata shematic astfel:



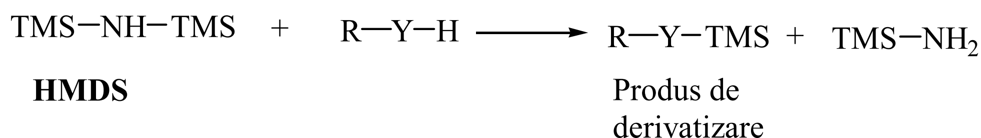
*g. N-Metil-N-(tert-butildimetilsilil) trifluoroacetamida (**MTBSTFA**)*

MTBSTFA este folosit ca agent de derivatizare tot pentru compusi de tipul R-Y-H, avind avantajul ca produsul de derivatizare este extrem de stabil la hidroliza. Reactia de derivatizare poate fi reprezentata shematic astfel:



*h. Hexametildisilazanul (**HMDS**)*

HMD este folosit ca agent de derivatizare pentru compusi de tipul R-Y-H. Reactia de derivatizare poate fi reprezentata shematic astfel:



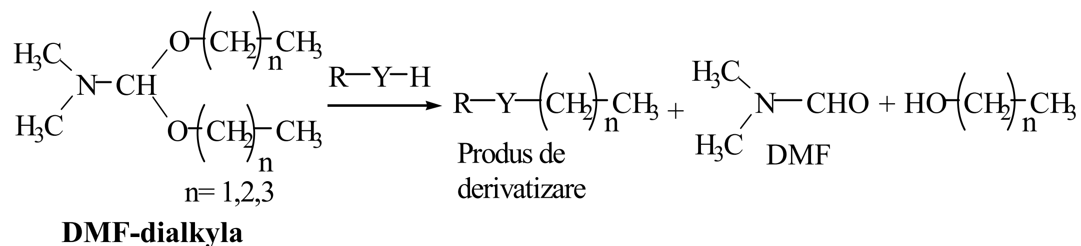
Este mai rar utilizat.

2. Alchilarea

Alchilarea este un alt procedeu de derivatizare, dar cu utilizarea mai limitata, in special pentru gruparile hidroxil. Cei mai utilizati reactanti de derivatizare sunt:

*a. Dimetilacetalul dimetilformamidei (**DMF-dialkyla**)*

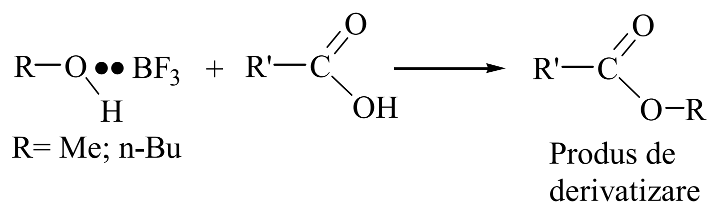
Diacetalul dimetilformamidei este folosit ca agent de derivatizare pentru compusi de tipul R-Y-H, in special pentru compusii carboxilici, dar fi pentru fenoli, amine, aminoacizi. Reactia de derivatizare poate fi reprezentata shematic astfel:



In functie de masa moleculara (controlata prin valoarea lui *n*) se controleaza timpii de retentie in GC.

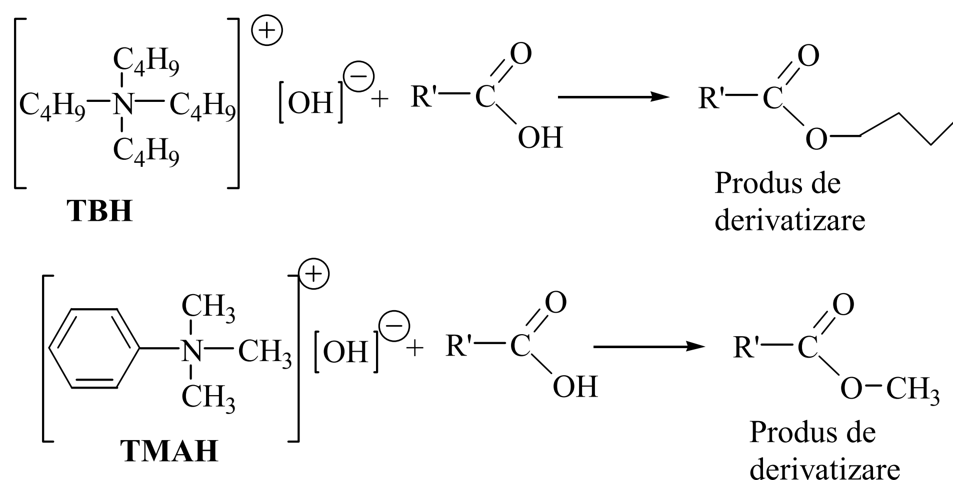
b. BF_3 – metanol (sau n-butanol)

Amestecul BF_3 – metanol sau BF_3 – n-butanol este folosit ca agent de derivatizare pentru compusii carboxilici. Reactia de derivatizare poate fi reprezentata shematic astfel:



c. Hidroxid de tetrabutilamoniu (**TBH**) si *hidroxid de trimetilanilinium* (**TMAH**)

Ambele substante sunt folosite cu precadere ca agenti de derivatizare pentru compusi carboxilici. Reactia de derivatizare poate fi reprezentata shematic astfel:

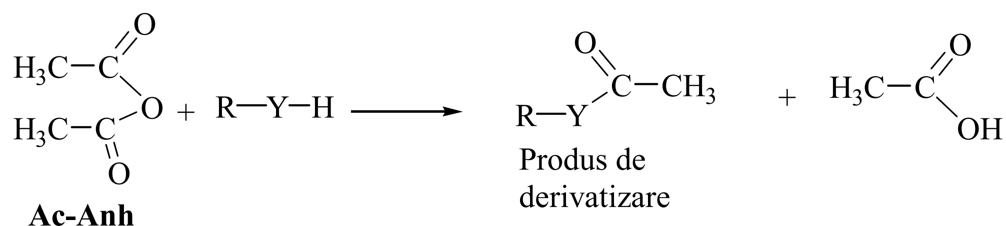


3. Acilarea

Acilarea este un procedeu de derivatizare cu specificitate mai mare, in special pentru gruparile hidroxil si amino. Cei mai utilizati reactanti de derivatizare sunt:

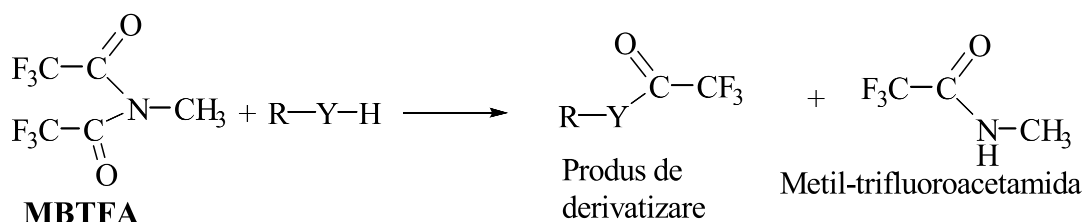
*a. Anhidrida acetica (**Ac-Anh**)*

Anhidrida acetica este folosita ca agent de derivatizare pentru compusi de tipul R-Y-H, in special pentru pentru alcooli, fenoli si amine. Reactia de derivatizare poate fi reprezentata shematic astfel:



*b. N-Metil-N-bis(trifluoroacetamida (**MBTFA**)*

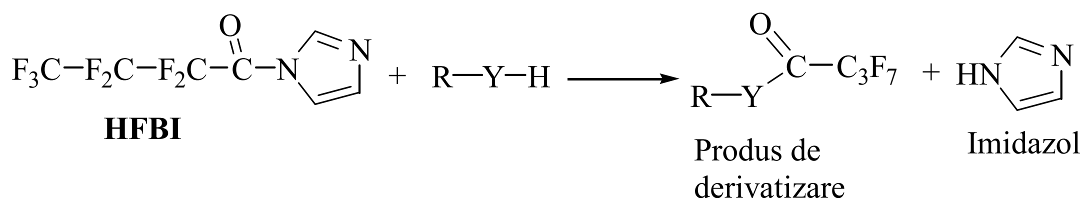
MBTFA este folosita ca agent de derivatizare pentru compusi de tipul R-Y-H, in special pentru pentru alcooli, fenoli, tioli si amine. Reactia de derivatizare poate fi reprezentata shematic astfel:



Produsul de derivatizare rezultat este stabil, iar conditiile de reactie sunt blinde. Reactia mai posda avantajul ca reactia decurge rapid cu aminele (primare si secundare) si mai greu pentru, alcooli, fenoli, tioli. Se observa ca in acest caz ca si produs secundar se obtine metil-trifluoroacetamida, care este voatila si poate fi indepartata usor din mediul de reactie.

c. Heptafluorobutirilimidazol ***(HFBI)***

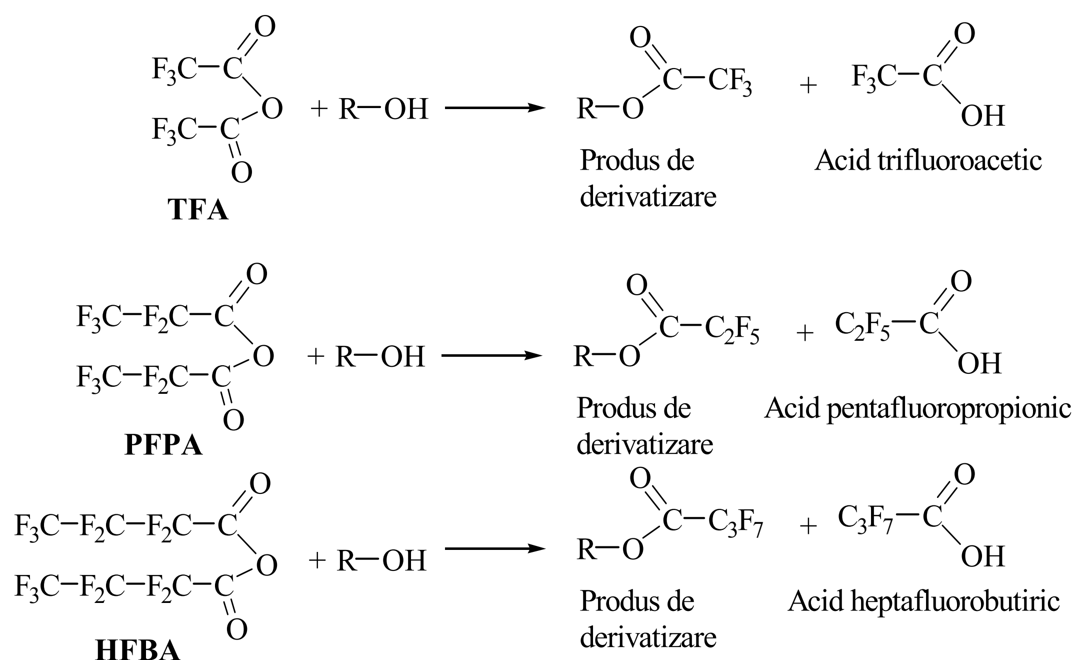
HFBI este folosita ca agent de derivatizare pentru compusi de tipul R-Y-H, in special pentru pentru alcooli, fenoli si amine. Reactia de derivatizare poate fi reprezentata shematic astfel:



Produsul de derivatizare rezultat este stabil, iar conditiile de reactie sunt blinde. Ca si produs secundar se obtine imidazolul, care este netoxic si se poate indepartata usor din mediul de reactie.

d. Anhidride fluorurate ***(TFA; PFPA; HFBA)***

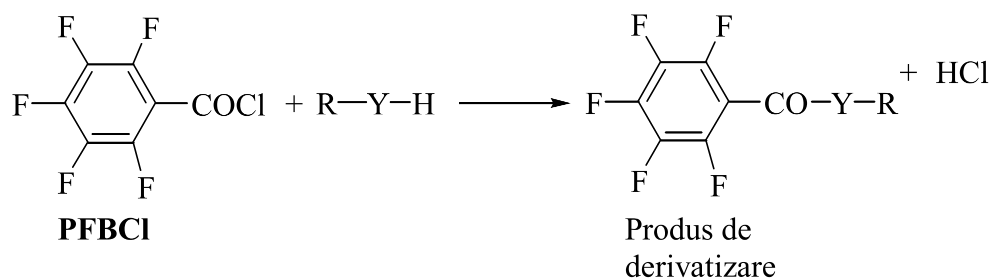
Anhidridele fluorurate [anhidrina trifluoroacetica (TFA), anhidrida pentafluoropropionica (PFPA) si anhidrida heptafluorobutirica (HFBA)] sunt folosite ca agenti de derivatizare in special pentru compusi hidroxilici. Reactia de derivatizare poate fi reprezentata shematic astfel:



Se observa ca in acest caz ca si produs secundar se obtin acizi organici fluorurati, care se pot neutraliza (si elimina) prin adaugarea unei baze slabe (trietilamina sau piridina).

e. Clorura de pentabluorobenzoil ***(PFBCl)***

PFBCl este folosit ca agent de derivatizare pentru compusi de tipul R-Y-H, in special pentru pentru alcooli, fenoli si amine. Reactia de derivatizare poate fi reprezentata shematic astfel:



PFBCl este foarte reactiv.

V.3.3.2. Metode practice de derivatizare

Practic, in acest moment, exista metode de derivatizare bine puse la punct

pentru toate clasele de compusi de interes din medicina judiciara si toxicologie. In cele ce urmeaza vom prezenta sintetic citeva metode de lucru experimentale de derivatizare pentru principalele tipuri de functiuni.

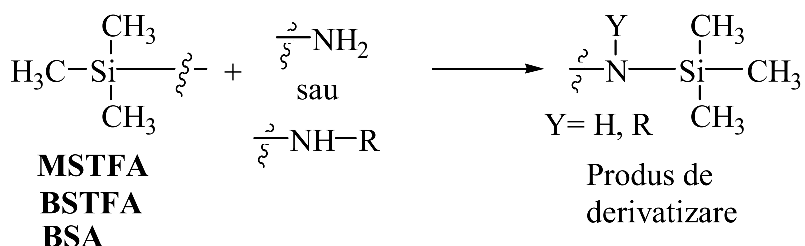
1. Functiunea amino, primara (-NH_2) si secundara (-NH-R)

Pentru functiunea amino sunt utilizate mai multe proceduri de derivatizare:

- derivatizare prin procedee de sililare: TMS, TBDMS;
- derivatizare prin procedee de acilare: TFA, Ac-Anh;
- drivatizare prin procedeul metilare: DMF-dimetha.

a. Derivatizare prin procedeul TMS

Si in acest caz, hidrogenul gruparii functionale amino dintr-un compus organic este inlocuit cu o grupare trimetilsilil, si in consecinta in spectrul GC-MS se va inregistrea o crestere de masa cu 72 unitati pentru fiecare grupare amino. Ca agenti de sililare se pot folosi MSTFA, BSTFA, BSA.

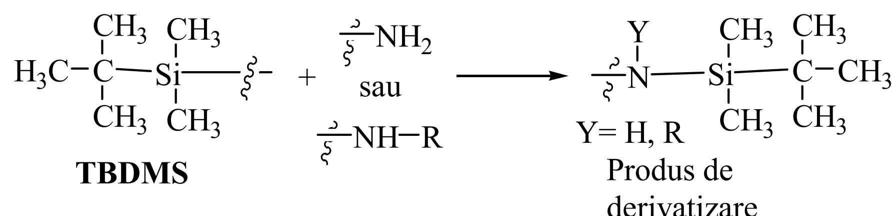


Procedeu experimental:

Intr-un recipient potrivit, se adauga cu o micropipeta 50 μL MSTFA (sau: BSTFA, BSA) peste o cantitate de 1-5 mg proba de analizat. Se adauga apoi 50 μL solvent (acetonitril, piridina, THF, DMF). Se inchide cu un capac etans recipientul si apoi se agita bine vasul, pentru a realiza o omogenizare cit mai buna a amestecului. Se incalzeste apoi vasul continind proba de analizat timp de 5 minute la 60^0C, pe baie de apa sau ulei. Se raceste apoi proba si se injecteaza 1-2 μL din proba in GC-MS.

b. Derivatizare prin procedeul TBDMS

In acest caz hidrogenul gruparii functionale dintr-un compus organic este inlocuit cu o grupare tertbutil-dimetilsilil, si in consecinta in spectrul GC-MS se va inregistrea o crestere de masa cu 114 unitati pentru fiecare amino. Ca agent de sililare se poate folosi TBDMS.

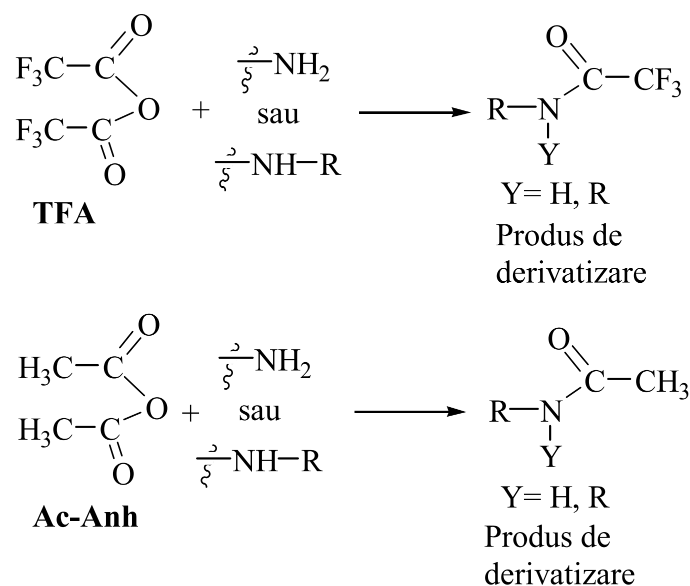


Procedeu experimental:

Intr-un recipient potrivit, se adauga cu o micropipeta 50 μL solvent (acetonitril, piridina, THF, DMF) peste o cantitate de 1-5 mg proba de analizat. Se adauga apoi 50 μL TBDMS. Se inchide cu un capac etans recipientul si apoi se agita bine vasul, pentru a realiza o omogenizare cit mai buna a amestecului. Se incalzeste apoi vasul continind proba de analizat timp de 15 minute la 60^0C, pe baie de apa sau ulei. Se raceste apoi proba si se injecteaza 1-2 μL din proba in GC-MS.

c. Derivatizare prin procedee de acilare: TFA, Ac-Anh

In acest caz hidrogenul gruparii functionale dintrun compus organic este inlocuit fie cu o grupare trifluoroacetil (si in consecinta in spectrul GC-MS se va inregistrea o crestere de masa cu 96 unitati pentru fiecare grupare amino) fie cu o grupare acetil (si in consecinta in spectrul GC-MS se va inregistrea o crestere de masa cu 42 unitati pentru fiecare grupare amino). Ca agenti de acilare se pot folosi fie anhidrida trifluuoroacetica (**TFA**) fie anhidrida acetica (**Ac-Anh**).



*c.1. Derivatizare prin procedee de acilare cu **Ac-Anh***

Intr-un recipient potrivit, se adauga cu o micropipeta 40 µL solvent (cel mai adesea piridina) peste o cantitate de 1-5 mg proba de analizat. Se adauga apoi 60 µL Ac-Anh. Se inchide cu un capac etans recipientul si apoi se agita bine vasul, pentru a realiza o omogenizare cit mai buna a amestecului. Se incalzeste apoi vasul continind proba de analizat timp de 30 minute la 60^0C, pe baie de apa sau ulei. Se evapora la sec trecind un curent de azot peste solutie. Se dizolva rezidiu in 25 µL solvent (piridina sau acetonitril). Se raceste apoi proba si se injecteaza 1-2 µL din proba in GC-MS.

*c.2. Derivatizare prin procedee de acilare cu **TFA***

Intr-un recipient potrivit, se adauga cu o micropipeta 200-500 µL solutie toluenica 0,05 M de trietilamina peste o cantitate de 1-5 mg proba de analizat. Se adauga apoi 50 µL TFA. Se inchide cu un capac etans recipientul si apoi se agita bine vasul, pentru a realiza o omogenizare cit mai buna a amestecului. Se incalzeste apoi vasul continind proba de analizat timp de 5 minute la 45^0C, pe baie de apa sau ulei. Se raceste si apoi se adauga 400-1000 µL solutie apoasa 5% de bicarbonat de

sodiu. Se agita bine pina cind stratul superior devine clar si apoi se centrifugheaza. Se injecteaza 1-2 µL din stratul superior al probei in GC-MS.

*d. Procedeul cu dimetil acetalul N,N-dimetilformamidei (**DMF-dimetha**).*

Intr-un recipient potrivit, peste o cantitate de maxim 0,1 mg proba de analizat se adauga cu o micropipeta 50 µL dimetil acetal al N,N-dimetilformamidei si 50 µL acetonitril. Se inchide cu un capac etans recipientul si apoi se agita bine vasul, pentru a realiza o omogenizare cit mai buna a amestecului. Se incalzeste apoi vasul continind proba de analizat timp de 30 minute la 60^0C, pe baie de apa sau ulei. Se injecteaza 1-2 µL din proba in GC-MS .

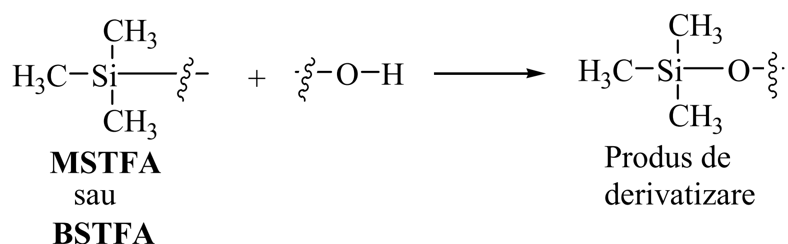
2. Functiunea hidroxil, -OH

In acest caz sunt preferate 3 proceduri de derivatizare:

- derivatizare prin procedeul TMS
- derivatizare prin procedeul TBDMS
- derivatizare prin procedeul acetil

a. Derivatizare prin procedeul TMS

In acest caz hidrogenul gruparii functionale dintr-un compus organic este inlocuit cu o grupare trimetilsilil, si in consecinta in spectrul GC-MS se va inregistrea o crestere de masa cu 72 unitati pentru fiecare hidroxil. Ca agenti de sililare se pot folosi MSTFA sau BSTFA.



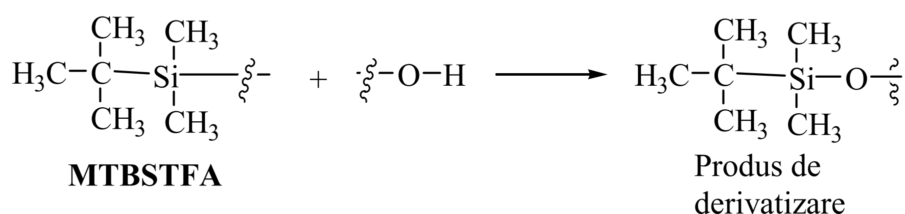
Procedeu experimental:

Intr-un recipient potrivit, se adauga cu o micropipeta 100 µL MSTFA (sau BSTFA) peste o cantitate de 1-5 mg proba de analizat. Se adauga apoi 50 µL de

solvent (in functie de proba de analizat, cel mai adesa piridina sau acetonitril). Se inchide cu un capac etans recipientul si apoi se agita bine vasul, pentru a realiza o omogenizare cit mai buna a amestecului. Se incalzeste apoi vasul continind proba de analizat timp de 5 minute la 60^0C, pe baie de apa sau ulei. Se raceste apoi proba si se injecteaza 1-2 μL din proba in GC-MS.

b. Derivatizare prin procedeul TBDMS

In acest caz hidrogenul gruparii functionale dintr-un compus organic este inlocuit cu o grupare tertbutil-dimetilsilil, si in consecinta in spectrul GC-MS se va inregistrea o crestere de masa cu 114 unitati pentru fiecare hidroxil. Ca agent de sililare se poate folosi MTBSTFA.



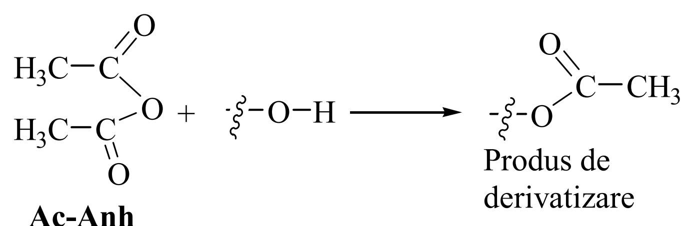
Procedeu experimental:

Intr-un recipient potrivit, se adauga cu o micropipeta 100 μL solvent (in functie de proba de analizat, cel mai adesa acetonitril) peste o cantitate de 1-5 mg proba de analizat. Se adauga apoi 100 μL de MTBSTFA. Se inchide cu un capac etans recipientul si apoi se agita bine vasul, pentru a realiza o omogenizare cit mai buna a amestecului. Se incalzeste apoi vasul continind proba de analizat timp de 15 minute la 60^0C, pe baie de apa sau ulei. Se raceste apoi proba si se injecteaza 1-2 μL din proba in GC-MS.

c. Derivatizare prin procedeul acetil

In acest caz hidrogenul gruparii functionale dintr-un compus organic este inlocuit cu o grupare acetil, si in consecinta in spectrul GC-MS se va inregistrea o

crestere de masa cu 42 unitati pentru fiecare hidroxil. Ca agent de acetilare se poate folosi anhidrida acetica.



Procedeu experimental:

Intr-un recipient potrivit, se adauga cu o micropipeta 40 µL solvent (in functie de proba de analizat, cel mai adesa piridina) peste o cantitate de 1-5 mg proba de analizat. Se adauga apoi 60 µL de Ac-Anh. Se inchide cu un capac etans recipientul si apoi se agita bine vasul, pentru a realiza o omogenizare cit mai buna a amestecului. Se incalzeste apoi vasul continind proba de analizat timp de 30 minute la 60^0C, pe baie de apa sau ulei. Se raceste apoi proba si se injecteaza 1-2 µL din proba in GC-MS.

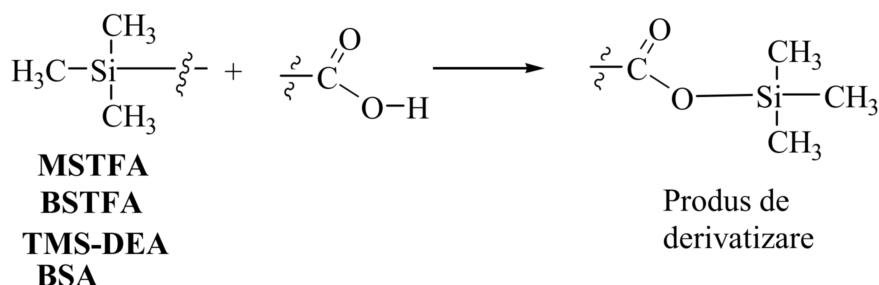
3. Functiunea carboxil, -COOH

Ca si in cazul hidroxilului, pentru functiunea carboxil sunt preferate 3 proceduri de derivatizare:

- derivatizare prin procedee de sililare: TMS, TBDMS;
- derivatizare prin procedeul de metilare: DMF-dimetha, Me-OH.

a. Derivatizare prin procedeul TMS

Si in acest caz, hidrogenul gruparii functionale carboxil dintr-un compus organic este inlocuit cu o grupare trimetilsilil, si in consecinta in spectrul GC-MS se va inregistrea o crestere de masa cu 72 unitati pentru fiecare carboxil. Ca agenti de sililare se pot folosi MSTFA, BSTFA, BSA. Pentru acizi cu mase moleculare mici se poate folosi si TMS-DEA.

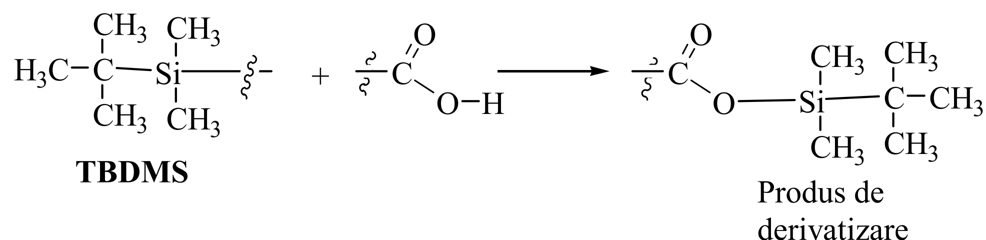


Procedeu experimental:

Intr-un recipient potrivit, se adauga cu o micropipeta 200 µL MSTFA (sau: BSTFA, BSA) peste o cantitate de 1-5 mg proba de analizat. Se inchide cu un capac etans recipientul si apoi se agita bine vasul, pentru a realiza o omogenizare cit mai buna a amestecului. Se incalzeste apoi vasul continind proba de analizat timp de 15 minute la 60^0C, pe baie de apa sau ulei. Se raceste apoi proba si se injecteaza 1-2 µL din proba in GC-MS.

b. *Derivatizare prin procedeul TBDMS*

In acest caz hidrogenul gruparii functionale dintr-un compus organic este inlocuit cu o grupare tertbutil-dimetilsilil, si in consecinta in spectrul GC-MS se va inregistrea o crestere de masa cu 114 unitati pentru fiecare carboxil. Ca agent de sililare se poate folosi TBDMS.



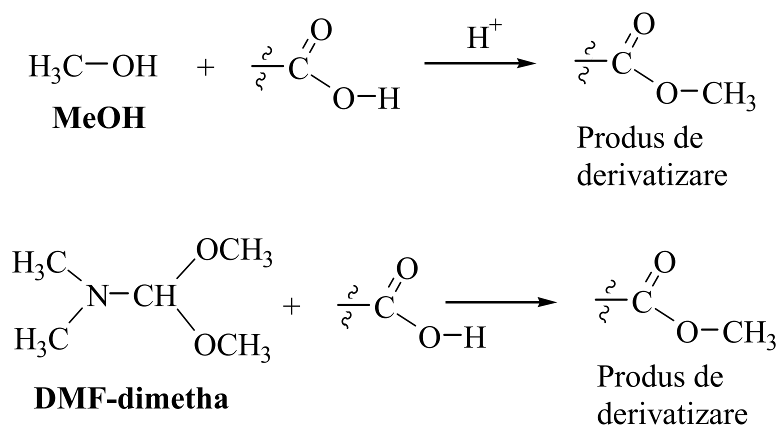
Procedeu experimental:

Intr-un recipient potrivit, se adauga cu o micropipeta 50 µL TBDMS peste o cantitate de 1-5 mg proba de analizat. Se adauga apoi solvent, daca este necesar (acetonitril, piridina, THF, DMF). Se inchide cu un capac etans recipientul si apoi

se agita bine vasul, pentru a realiza o omogenizare cit mai buna a amestecului. Pentru acizii cu masa moleculara mare, se incalzeste apoi vasul continind proba de analizat timp de 5-20 minute la 60^0C, pe baie de apa sau ulei. Pentru acizii cu masa moleculara mica, se lasa la temperatura camerei vasul continind proba de analizat timp de cca 30 minute. Se raceste apoi proba si se injecteaza 1-2 μL din proba in GC-MS.

c. Derivatizare prin procedeul metilare

In acest caz hidrogenul gruparii functionale dintrun compus organic este inlocuit cu o grupare metil, si in consecinta in spectrul GC-MS se va inregistrea o crestere de masa cu 14 unitati pentru fiecare carboxil. Ca agent de metilare se poate folosi metanolul (**MeOH**) sau dimetil acetalul N,N-dimetilformamidei (**DMF-dimetha**).



Procedee experimentale

1. Procedeul cu metanol anhidru si acid sulfuric concentrat

Intr-un recipient potrivit, peste o cantitate de 1-5 mg proba de analizat se adauga cu o micropipeta 250 μL MeOH si 50 μL H_2SO_4 concentrat (ca si catalizator al reactiei de esterificare). Se inchide cu un capac etans recipientul si apoi se agita bine vasul, pentru a realiza o omogenizare cit mai buna a amestecului. Se incalzeste

apoi vasul continind proba de analizat timp de 45 minute la 60^0C, pe baie de apa sau ulei.

Se adauga apoi 500 µL cloroform sau clorura de metilen si se agita timp de 2 min. Se injecteaza 1-2 µL din proba in GC-MS (din patura inferioara organica ce contine proba).

Acest procedeu permite identificarea urmelor de acid. Ca si produs secundar se obtine dimetilsulfatul (**DMS**), usor de identificat dupa fragmente in MS.

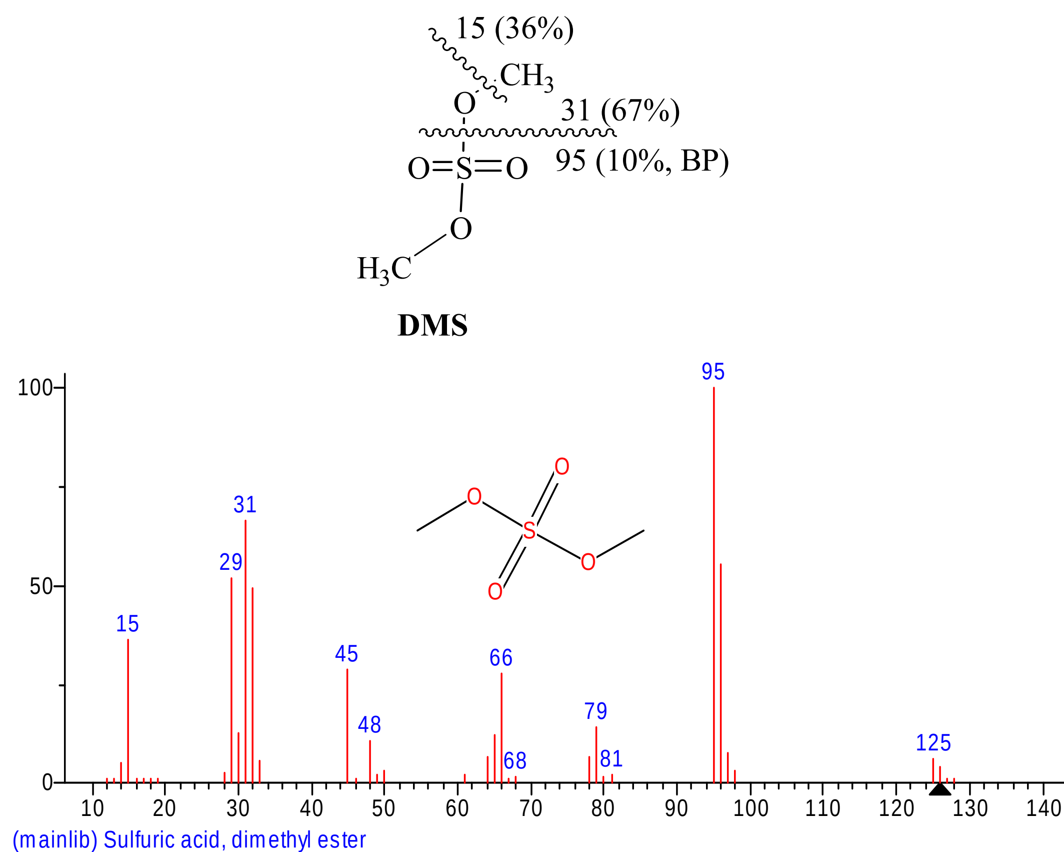


Figura V.3.2. *Spectrul de masa al dimetilsulfatului*

2. *Procedeul cu metanol anhidru si acid clorhidric concentrat*

Intr-un recipient potrivit, peste o cantitate de 1-5 mg proba de analizat se adauga cu o micropipeta 250 µL solutie metanolica 3N de HCl (MeOH anh. si HCl conc.). Se

inchide cu un capac etans recipientul si apoi se agita bine vasul, pentru a realiza o omogenizare cit mai buna a amestecului. Se incalzeste apoi vasul continind proba de analizat timp de 20 minute la 60^0C, pe baie de apa sau ulei. Se injecteaza 1-2 µL din proba in GC-MS .

3. *Procedeul cu metanol anhidru si BF_3*

Intr-un recipient potrivit, peste o cantitate de 1-5 mg proba de analizat se adauga cu o micropipeta 250 µL solutie metanolica (5-10%) de BF_3 (MeOH anh. si HCl conc.). Se inchide cu un capac etans recipientul si apoi se agita bine vasul, pentru a realiza o omogenizare cit mai buna a amestecului. Se incalzeste apoi vasul continind proba de analizat timp de 20 minute la 60^0C, pe baie de apa sau ulei. Se raceste pe baie de apa cu gheata si apoi se adauga 2 mL apa distilata. Se transvazeaza amestecul intr-o pilnie de separare, se adauga 2 mL clorura de metilen si se agita timp de 5 min. Se separa patura organica (inferioara) si apoi in patura apoasa se adauga din nou 2 mL clorura de metilen, se agita timp de 5 min. Si apoi se separa din nou patura organica. Extractele reunite de clorura de metilen se usuca pe sulfat de sodiu anhidru. Se filtraza si apoi solutia de clorura de metilen se concentreaza prin evaporare pina la 100 µL, fie trecind un curent de azot fie se evapora normal. Se injecteaza 1-2 µL din proba in GC-MS (din patura inferioara organica ce contine proba).

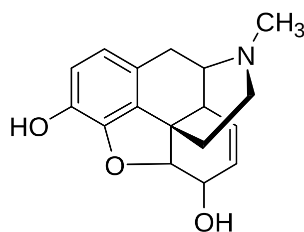
4. *Procedeul cu dimetil acetalul N,N-dimetilformamidei (**DMF-dimetha**).*

Intr-un recipient potrivit, peste o cantitate de 1-5 mg proba de analizat se adauga cu o micropipeta 100 µL dimetil acetal al N,N-dimetilformamidei. In cazul in care proba nu se dizolva bine, se poate adauga 100 µL solvent (cloroform, clorura de metilen, piridina, THF sau DMF). Se inchide cu un capac etans recipientul si apoi se agita bine vasul, pentru a realiza o omogenizare cit mai buna a amestecului. Se incalzeste apoi vasul continind proba de analizat timp de 15 minute la 60^0C, pe baie de apa sau ulei. Se injecteaza 1-2 µL din proba in GC-MS .

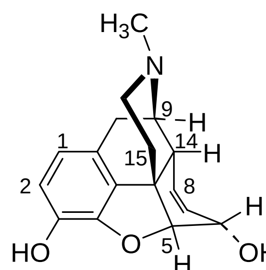
V.4. Droguri din opiu si derivati

V.4.1. Introducere

Opioid (greacă ὄπιον şi εἶδος - asemănător opiului) este un termen care defineste o grupa de substante chimice heterogene naturale si sintetice inrudite cu morfina.



Morfina



Morfina, structura spatiala

Opioidele sunt substante cu actiune deprimanta asupra sistemului nervos central (SNC) iar spectrul lor de actiune al este foarte complex si diferit, cel mai important rol al lor fiind actiunea intens analgezica. In acelasi timp opidele au o serie de efecte secundare nedorite, de departe efectul secundar cel mai nedorit fiind efectul de dependenta. Dintre celelalte efecte secundare citam: deprimarea respiratiei (hipoventilatie pulmonara, hipoxie), scaderea peristaltismului intestinal, efecte hipnotice, anxiolitice, halucinogene si euforie. Ultimele doua efecte secundare constitue efectele narcotice, nedorite ale opioidelor. Acest ansamblu de actiuni face ca opioidele sa fie incadrate in clasa de substante analgezice narcotice.

Compusii din clasa opioidelor pot fi clasificati dupa mai multe criterii. Tinind cont de provenienta lor, opioidele se impart in mai multe grupe:

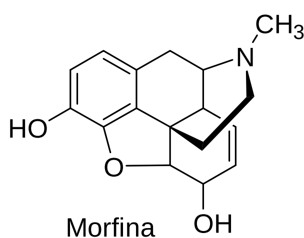
1. alcaloizi naturali din opiu - care cuprinde morfina, codeina si tebaina;
2. derivati semisintetici de morfina;
3. derivati sintetici de morfina;
4. antagonisti ai morfinei - substante folosite ca antidot pentru droguri.

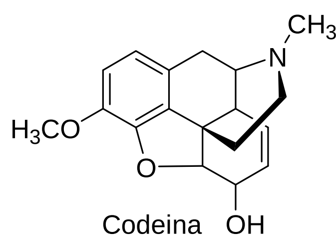
Produsii naturali ai clasei sunt reprezentati de alcaloizi din opiu. Opiul este constituit din latexul uscat obtinut din fructele necoapte de mac (*Papaver somniferum*). In opiu se gasesc circa 25 de alcaloizi (alaturi de alti compusi), intre care si alcaloizii cu nucleu fenantrenic, cel mai important dintre acestia, pentru proprietatile analgezice narcotice, fiind morfina.

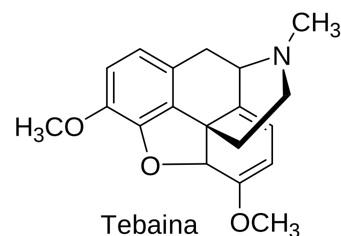
Opiul se obtine numai pe cale manuala. Recoltarea are loc la circa 12 zile de la caderea petalelor florilor, atunci cand capsulele ajung la dimensiunea maxima; ea se face prin intermediul scarificarii (capsulele de mac sunt incizate cu nişte lame speciale numai pană la jumătatea capsulei), operatie desfasurata numai pe timp frumos. Datorita inciziilor, latexul din capsulele de mac, alb la inceput se brunifica si se coaguleaza. Astfel coagulat, se racleaza cu ajutorul unui razuitor din lemn sau din metal. Latexul rezultat se usuca la soare cu atenție pana cand capata consistenta unei paste foarte dense si este brunifiact complet. Este strans in bucati de dimensiuni variabile si presat in forme variabile. Latexul astfel obtinut constituie asa numitul “opiu baza” si contine circa 10–12% alcaloizi, 10–15 % apa, acizi organici, rezine etc.

Prin incălzirea opiului baza la temperaturi scazute se obtine o solutie de culoare maronie care supusa filtrarii (pentru indepartarea reziduurilor vegetale) si apoi evaporarii, conduce la formarea unei pudre care reprezinta forma „opiului de fumat”, cu un continut mult mai mare de morfina fata de latex.

Alcaloizii morfinici sunt compusi organici naturali cu schelet fenantrenic care provin formal din morfina, cei mai importanti fiind morfina, codeina si tebaina:





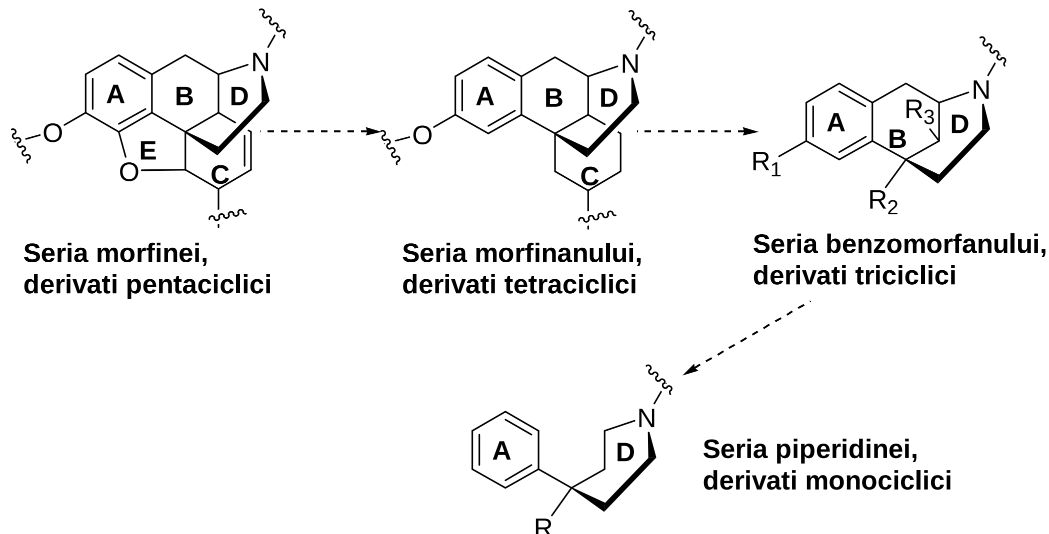


Pentru specialistii in medicina judiciara o importanta deosebita o are clasificarea opioidelor dupa structura chimica, tinind cont de numarul de cicluri care se pastreaza din alcaloidul baza, morfina:

- derivati pentaciclici (seria morfinei);
- derivati tetraciclici (seria morfinanului);
- derivati triciclici (seria benzomorfanului);
- derivati monociclici (seria piperidinei).

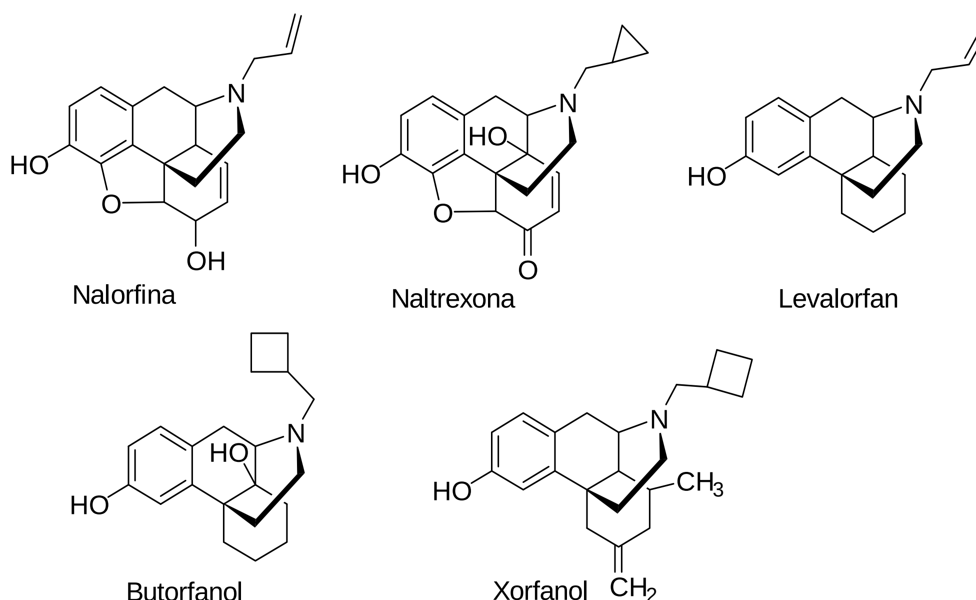
[mai exista o clasa admisa, derivati hexaciclici (seria buprenorfinei), dar care nu prezinta importanta pentru practica judiciara intriucit acesti compusi nu sunt utilizati ca si droguri]

Desi derivatii monociclici piperidinici aparent nu au nimic in comun cu morfina, ei sunt derivati opioidici de sinteza care provin formal prin distrugerea legaturilor dintre ciclurile initiale din morfina:



Antagonisti narcotici

Antagonistii narcotici reprezinta o grupa de morfinomimetice care au proprietatea de a inversa majoritatea actiunilor farmacologice de natura narcotica a drogurilor. Antagonistii narcotici sunt larg utilizati in curele de dezintoxicare a toxicomanilor avind avantajul ca nu produc dependenta si nici sindrom de abstinenta. Principalele medicamente antagonist narcotice sunt *Nalorfina*, *Naltrexona, Levalorfanul, Butorfanol si Xorfanolul*.



V. 4.2. Metabolizarea opioidelor

Asa dupa cum s-a aratat anterior, intr-un sistem biologic orice drog sufera procese de metabolizare si degradare. Acest proces de metabolizare are loc in doua etape conducind la produsi cu structura mai simpla pe care organismul viu ii elimina fie ca atare (in cantitate mica) fie ii transforma in produsi de conjugare(in cantitate mare):

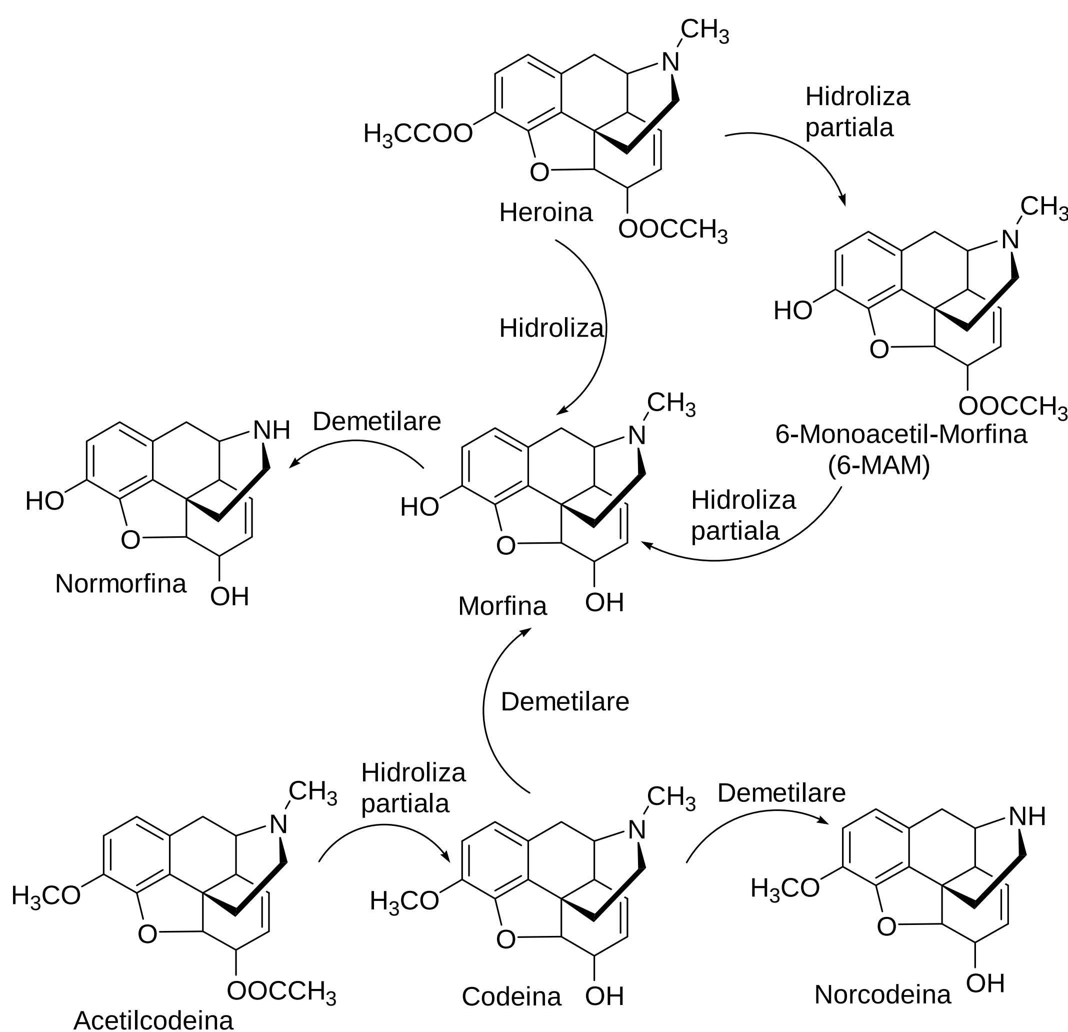
- faza metabolica I sau faza reactiilor metabolice, cuprinde reactiile de hidroliza, oxidare si reducere;
- faza metabolica II sau faza reactiilor de conjugare, care cuprinde procesele de conjugare ale substantelor cu diversi compusi din organism cum ar fi

aminoacizi (glutation, glutamina, etc) si acidul glucuronic.

In practica toxicologica, prin procesul de preparare si pretratament al probelor, se realiza nu numai izolarea drogului si a produsilor de metabolizare si clivajul produsilor de conjugare in metaboliti. Din aceste motive cunoasterea produsilor de metabolizare a drogurilor este de importanta cruciala pentru specialistii in medicina judiciara.

1. Metabolizarea derivatilor pentaciclici (seria morfinei)

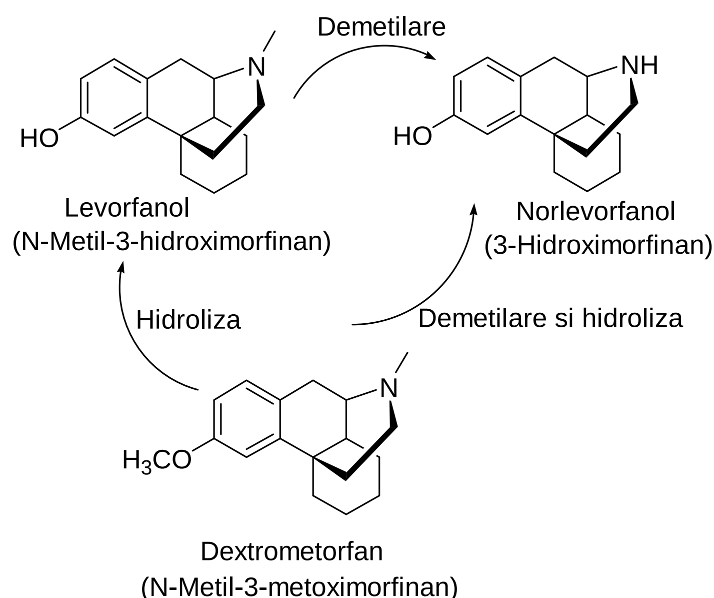
In aceasta grupa intra morfina si analogii ei pentaciclici. Cele mai cunoscute droguri din aceasta clasa sunt *Morfina si Heroina*, a caror schema de metabolizare este prezentata mai jos:



In organismul viu heroina este rapid metabolizat la 6-MAM. Datorită timpului relativ scurt de detectare a 6-MAM, de obicei in probe se detecteaza morfina si codeina, respectiv produsii lor de *N*-demetilare (normorfina si norcodeina). Acetilcodeina este un produs secundar rezultat la fabricarea ilicita a heroinei, si poate fi el gasit in probele biologice.

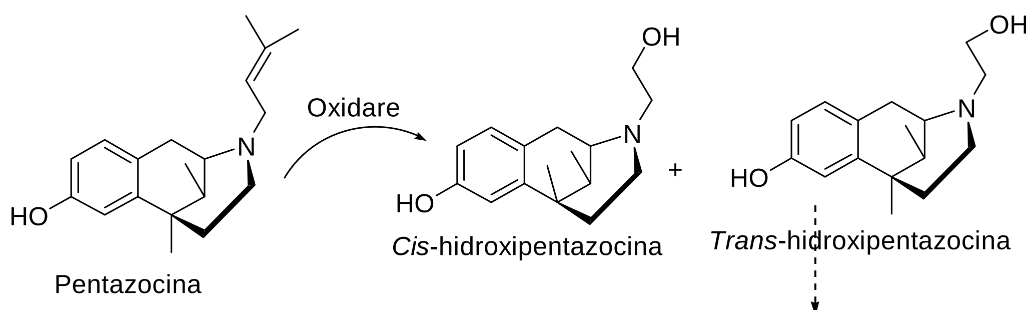
2. **Metabolizarea derivatilor tetraciclici (seria morfinan)**

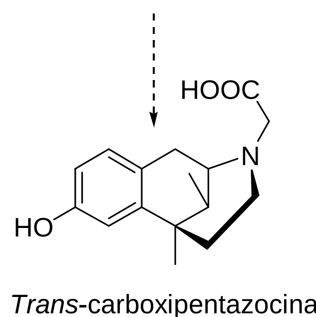
Cele mai cunoscute droguri din aceasta clasa sunt *Levorfanolul si Dextrometorfanul* , a caror schema de metabolizare este prezentata mai jos:



3. **Metabolizarea derivatilor triciclici (seria benzomorfan)**

Cele mai cunoscute droguri din aceasta clasa sunt *Pentazocina si Fenazocina*. Schema si produsii de metabolizare a pentazocinei este prezentata mai jos:

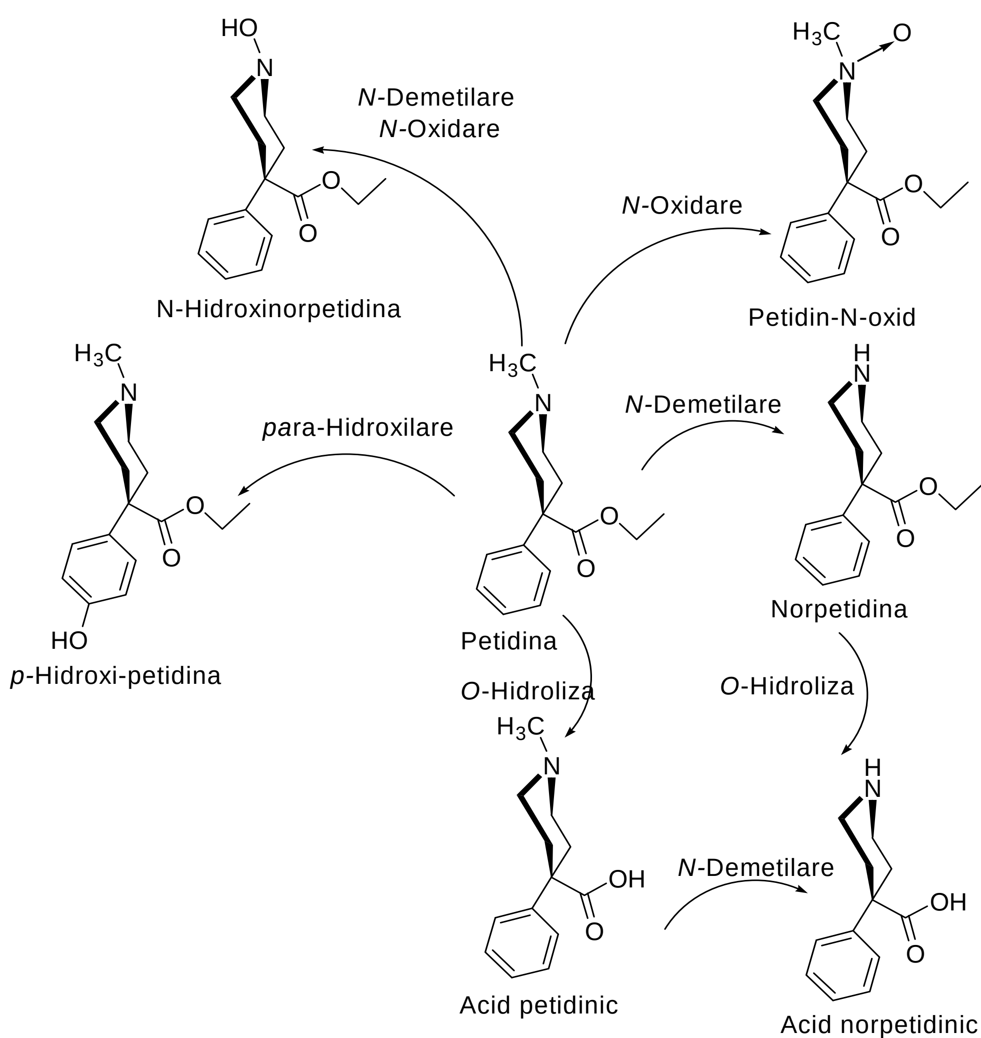




Trans-carboxipentazocina

4. Metabolizarea derivatilor monociclici (seria piperidinei)

Cele mai cunoscute droguri din aceasta clasa sunt *Petidina (Meperidine, Demerol), α-Prodine, Profadol si Fentanil*. Schema si produsii de metabolizare a petidinei este prezentata mai jos:



V. 4.3. Analiza prin GC-MS in cazul opiaceelor

Atit drogurile in sine cit si produsi de metabolizare ai opiaceelor se pot determina prin GC-MS. Din acest motiv cunoasterea modului de fragmentare, identificarea fiecarui fragment si in final identificarea structurii acestor metaboliti, constituie dovezi solide in medicina judiciara si trebuiesc cunoscute de catre specialistii in domeniu.

Spectrele de masa ale opiaceelor se regasesc, liber (fara a fi necesar plata), in mai toate bazele de date. Ceea ce nu exista in aceste baze de date, sunt reactiile de fragmentare si corelatiile intre ele, pe care noi le vom prezenta in continuare in acest curs, si care permit identificarea su relativa usurinta a spectrelor de masa.

1. Seria morfinei

In aceasta grupa intra morfina si analogii ei pentaciclici. Prezentam in continuare spectrele de masa (GC-MS, Electron Impact) ale principalelor droguri si produsi de metabolizare din aceasta clasa: *Morfina, Heroina*, *6-Monoacetil-Morfina (6-MAM), Codeina, Acetilcodeina(6-MAC):*

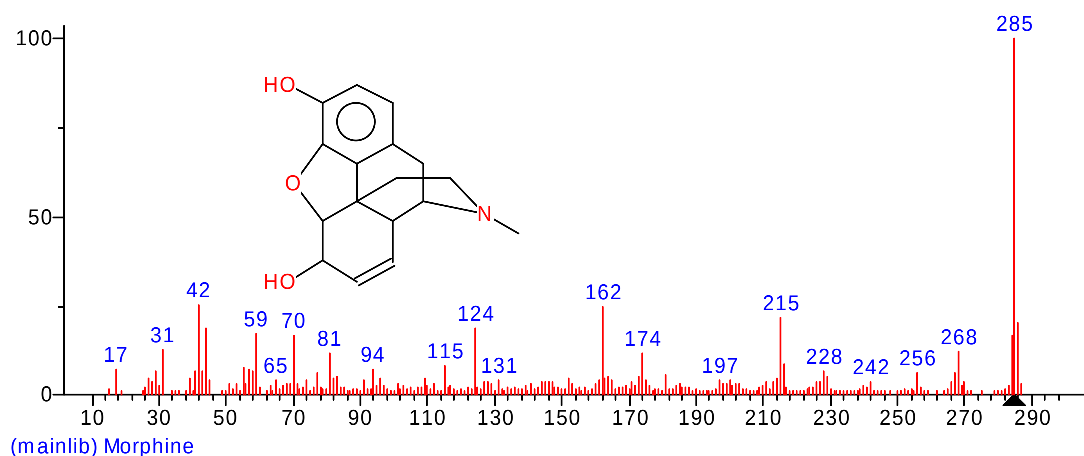


Figura 1. *Spectrul de masa al morfinei*

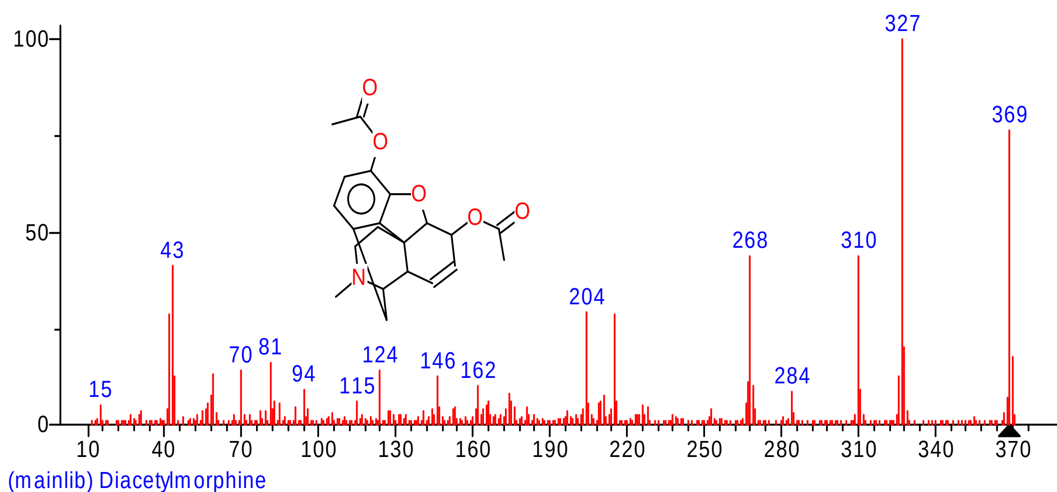


Figura 2. *Spectrul de masa al heroinei*

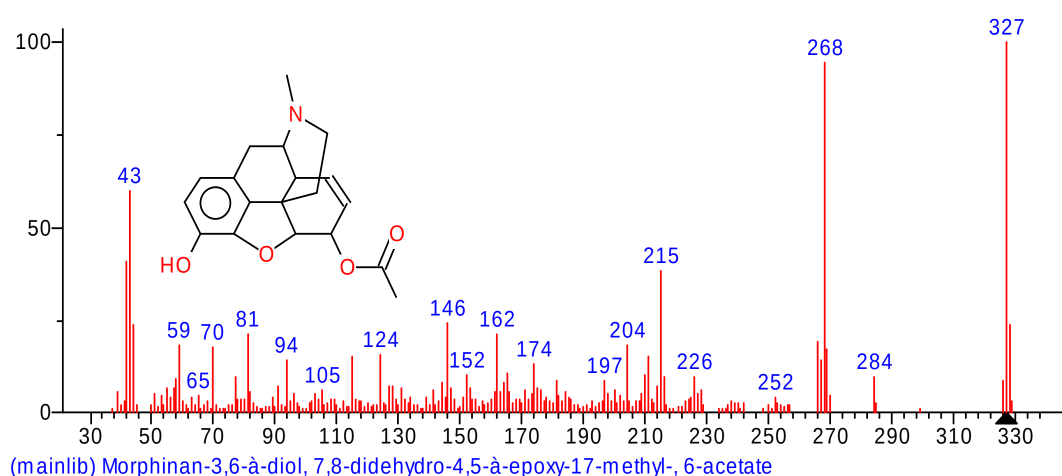


Figura 3. *Spectrul de masa al 6-MAM*

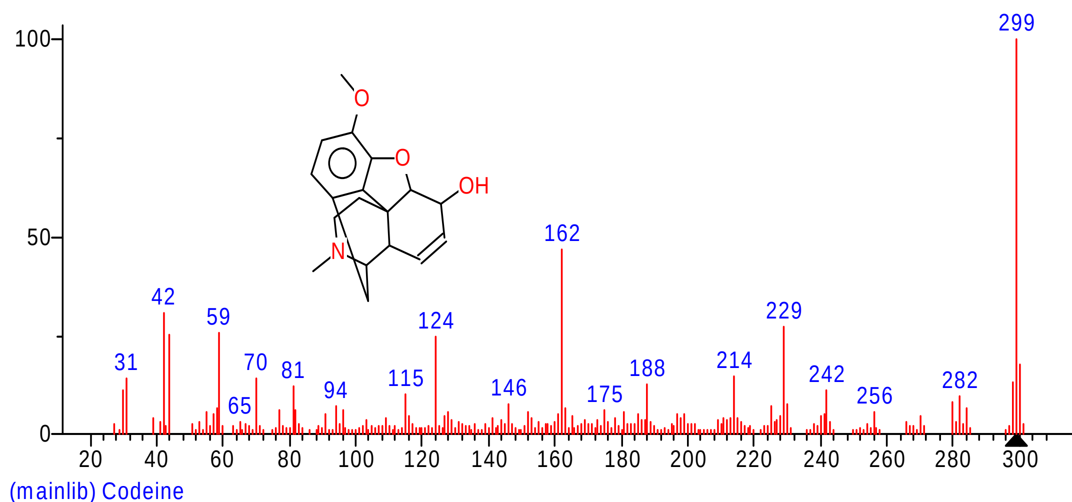


Figura 4. *Spectrul de masa al codeinei*

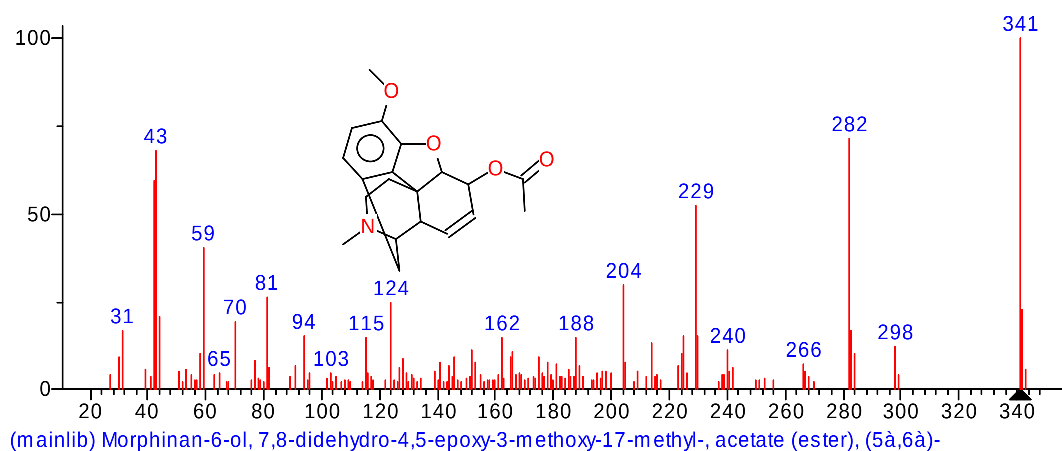


Figura 5. *Spectrul de masa al acetilcodeinei*

Asa dupa cum se observa de mai sus, toti acesti compusi poseda spectre de masa asemanatoare, dar cu anumite particularitati. Din spectrul heroinei se observa ca ionul molecular este foarte intens [M^+ (77%), m/z= 369)iar in urma unei fragmentari de tip α la nivelul grupei functionale esterice (insotita de transferul unui proton) rezulta 6-MAM (care este pic de baza, 100%, m/z= 327), iar din acesta din urma, tot printr-o fragmentare de tip α la nivelul grupei functionale esterice (insotita de transferul unui proton), rezulta morfina (M^+, m/z = 285), Fig. 6:

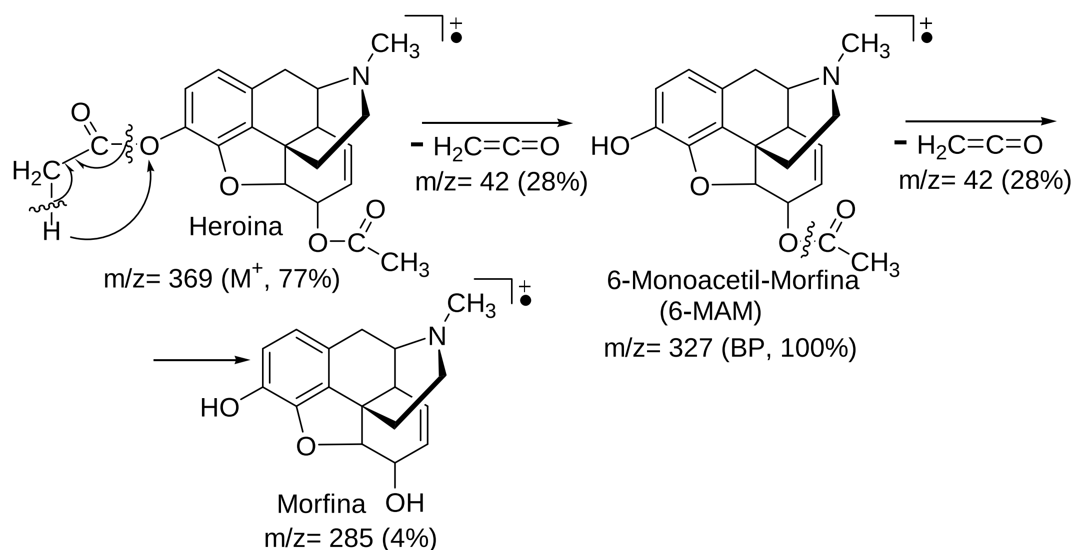


Figura 6. *Schema reactiei de fragmentare a heroinei la morfina*

Din spectrul 6-MAM, se observa ca observa ca ionul molecular este foarte intens fiind chiar pic de baza (M^{+}= BP, 100%), si tot printr-o fragmentare de tip α la nivelul grupei functionale esterice(insotita de transferul unui proton), rezulta morfina, Fig. 7:

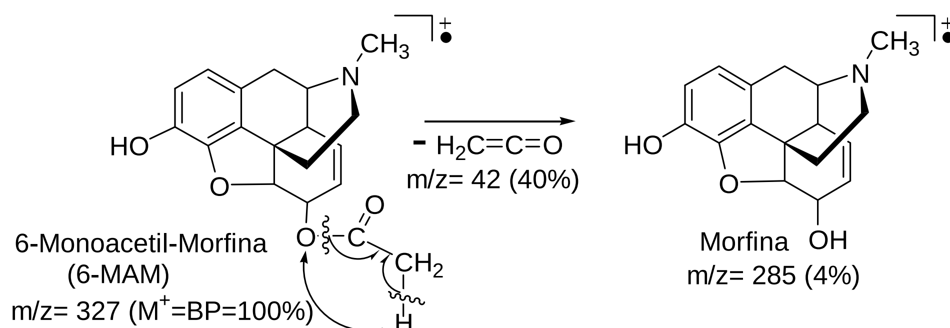


Figura 7. *Schema reactiei de fragmentare a 6-MAM la morfina*

Din spectrul 6-MAC, se observa ca observa ca ionul molecular este de asemenea foarte intens fiind pic de baza (M^{+}= BP, 100%), si tot printr-o fragmentare de tip α la nivelul grupei functionale esterice (insotita de transferul unui proton), rezulta codeina (m/z = 299, 4%). Fragmentarea de tip α la nivelul grupei functionale esterice a codeinei conduce la un radical al morfinei (m/z= 284, 6%), Fig. 7'.

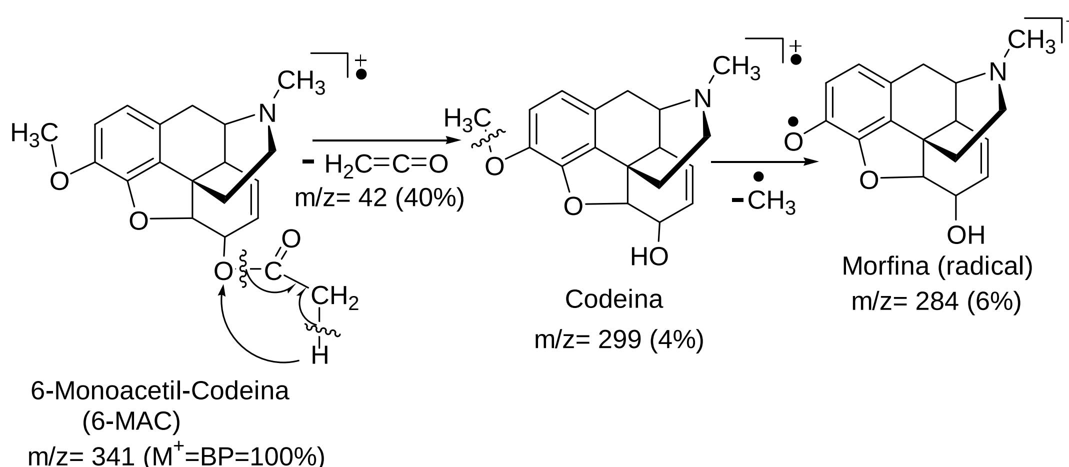


Figura 7'. *Schema reactiei de fragmentare a 6-MAC la morfina*

In continuare, principalele reactii de fragmentare sunt sunt comune, iar pentru simplificare, le vom prezenta doar la morfina.

Principalele reactii de fragmentare sunt fragmentarile complexe de tip α si β la nivelul grupei functionale aminice tertiare, insotite de transferul unuia sau mai multor protoni si electroni. Astfel, picurile de la m/z= 215 (22%) si m/z= 70 (17%) sunt picuri datorate fragmentarilor complexe de tip α si β la nivelul grupei functionale aminice tertiare, insotite de transferul a 2 protoni si a mai multor electroni; picurile de la m/z= 204 (3%) si m/z= 81 (15%) sunt picuri datorate fragmentarilor complexe de tip α si β la nivelul grupei functionale aminice tertiare, insotite de transferul a 3 protoni si a mai multor electroni, Fig. 8.

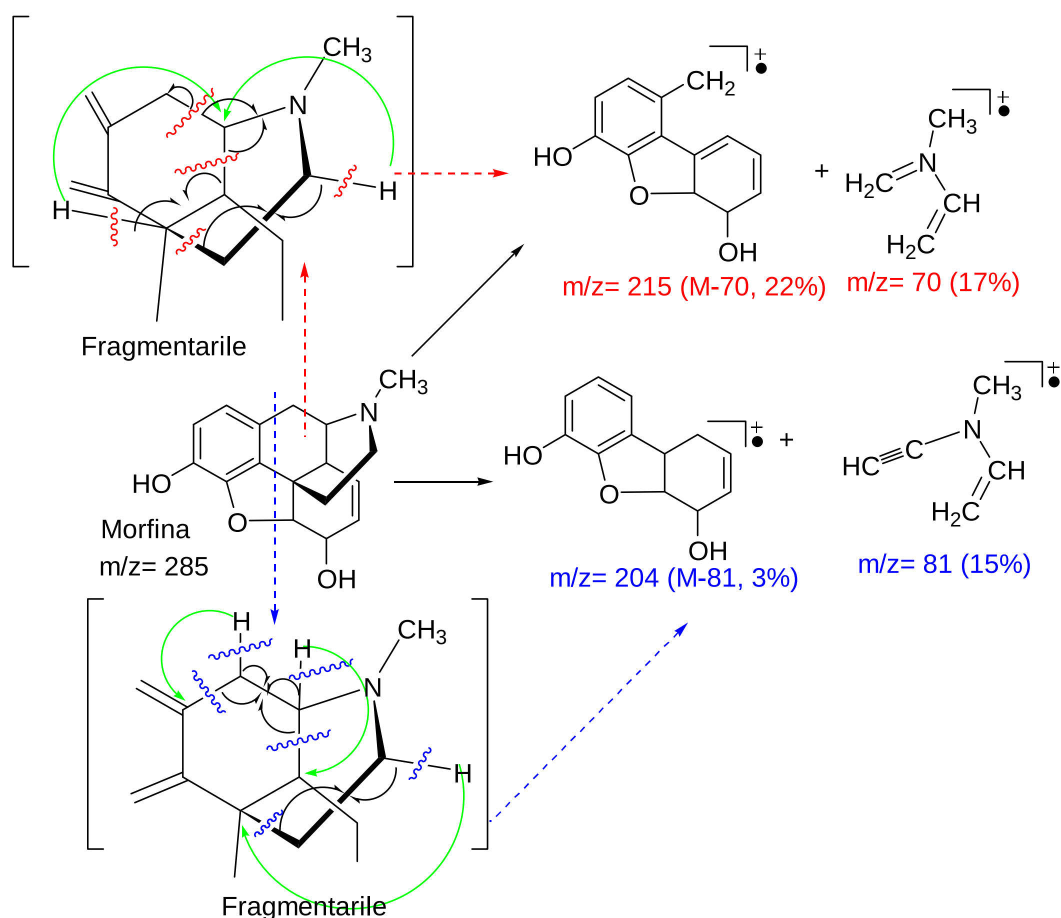


Figura 8. *Fragmentari complexe de tip α si β la nivelul grupei functionale aminice tertiare, in cazul morfinei*

Fragmentele de la m/z= 226 (8%) si m/z= 59 (17%) si respectiv m/z= 228 (10%) si m/z= 57 (8%) sunt explicate tot prin fragmentarile complexe de tip α si β la nivelul grupei functionale aminice tertiare, insotite de transferul a 2 protoni si a mai multor electroni (Fig. 9).

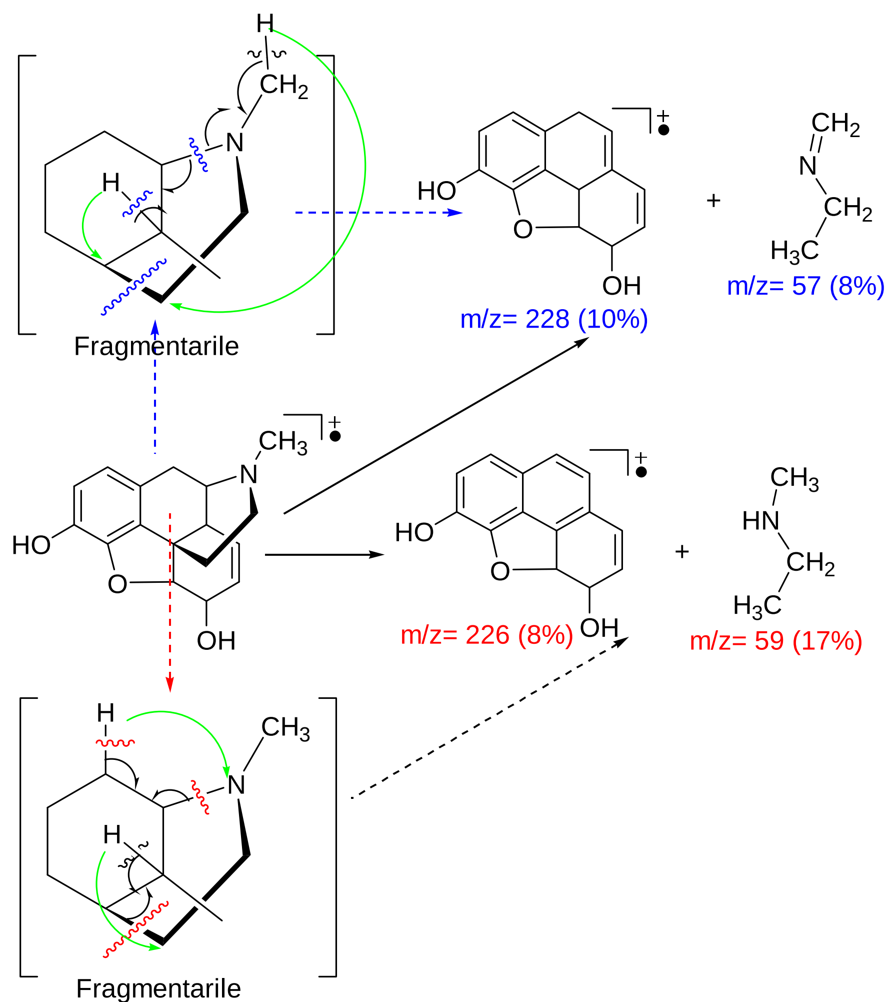


Figura 9. *Fragmentari complexe de tip α si β la nivelul grupei functionale aminice tertiare, insotite de transferul a 2 protoni si a mai multor electroni in cazul morfinei*

Fragmentele de la m/z= 216 (9%), 162 (25%), 124 (19%), 70 (17%) si 42 (25%), sunt explicate printr-o succesiune de reactii de fragmentare: fragmentarile complexe de tip α si β la nivelul grupei functionale aminice (insotite de transferul

unora sau mai multor protoni si electroni), fragmentare retro Diels-Alder, transpozitii de schelet, Fig. 10.

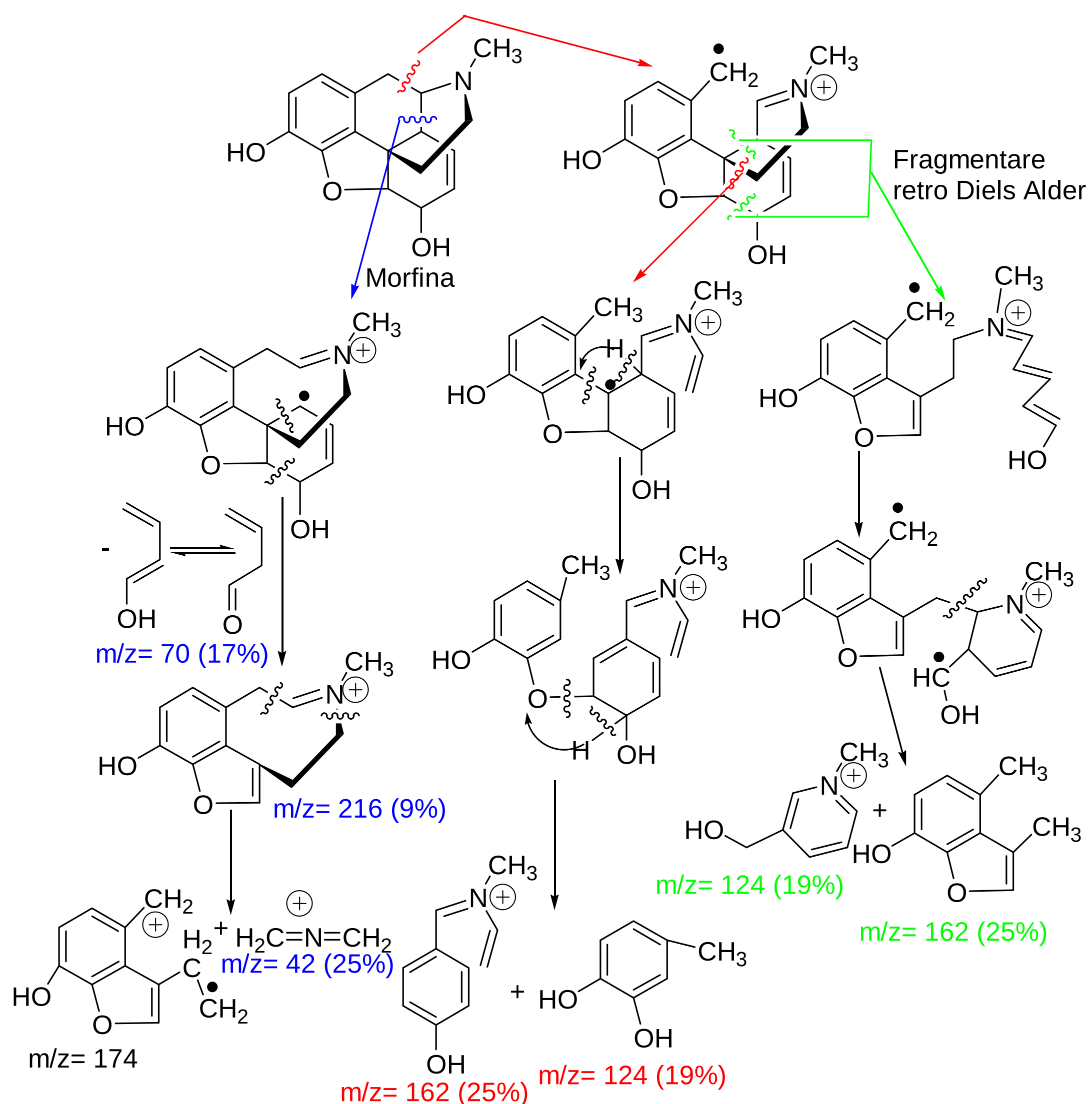


Figura 10. *Fragmentari complexe la morfina*

Fragmentul de la m/z= 268 (12%) se datoreste fragmentarii de tip α la nivelul grupei functionale fenolice, Fig. 11.

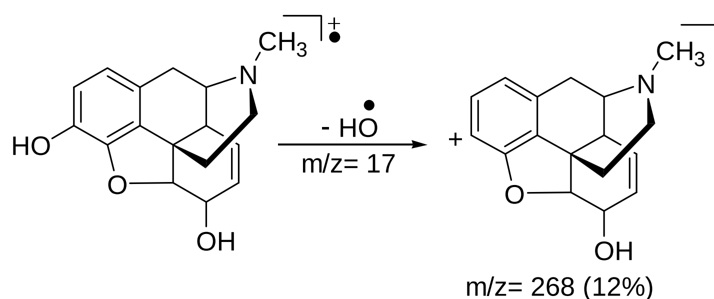


Figura 11. *Schema reactiei de fragmentare α la nivelul grupei functionale fenolice din morfina*

Caracteristici comune si deosebiri in spectre

- ionii moleculari sunt fie foarte intensi fie, cel mai adesea, picuri de baza. Ei sunt urmati de picuri M+1 (intense) si precedati de M-1 (mai putin intense);
- principala reactie de fragmentare este fragmentarea de tip α si β la nivelul grupei functionale aminice tertiare;
- spectrele contin picuri specifice la m/z= 42, 59, 70, 81 (si cele aferente de la M-42, M-59, M-70, M-81), caracteristice fragmentari de tip α si β la nivelul grupei functionale aminice tertiare;
- pentru codeina si 6-MAC apar 2 picuri specifice la m/z= 282 si m/z= 229

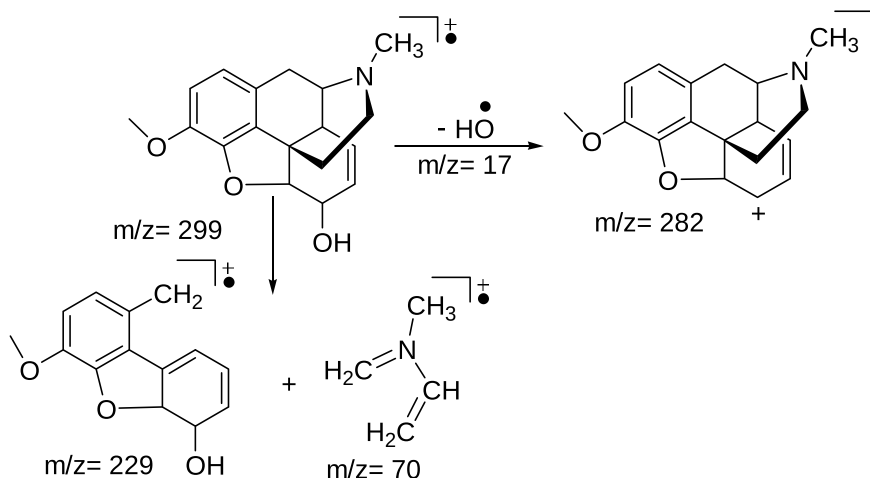


Figura 12. *Schema reactiei de fragmentare α la nivelul grupei functionale alcoolice si fragmentarile complexe de tip α si β la nivelul grupei functionale aminice tertiare, insotite de transferul a 2 protoni si a mai multor electroni in cazul codeinei si 6-MAC*

care se datoresc fragmentarii de tip α la nivelul grupei functionale alcoolice si respectiv fragmentarii de tip α si β la nivelul grupei functionale aminice tertiare, fig. 12.

2. Seria morfinanului

In aceasta grupa intra analogii tetraciclici de morfina. Prezentam in continuare spectrele de masa (GC-MS, Electron Impact) ale principalelor droguri din aceasta clasa: *Levorfanolul si Dextrometorfanul:*

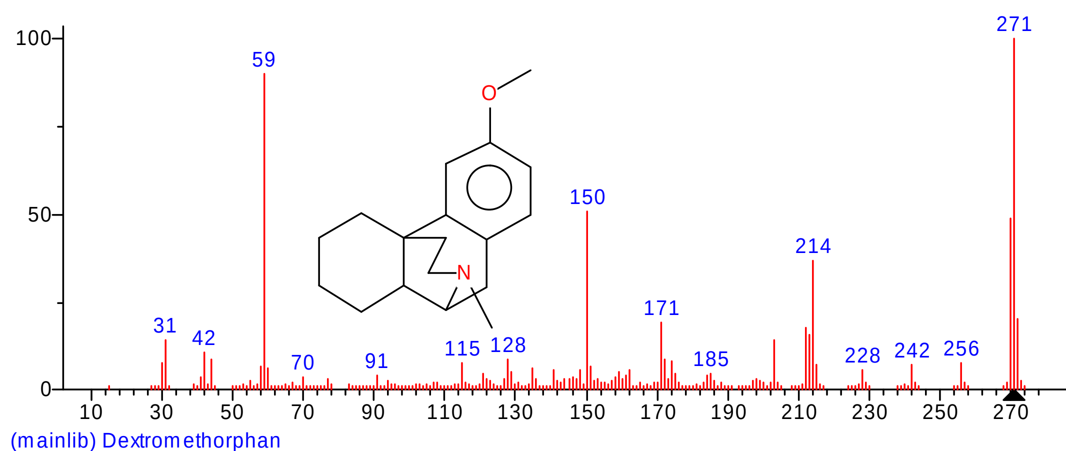


Figura 13. *Spectrul de masa al dextrometorfanului*

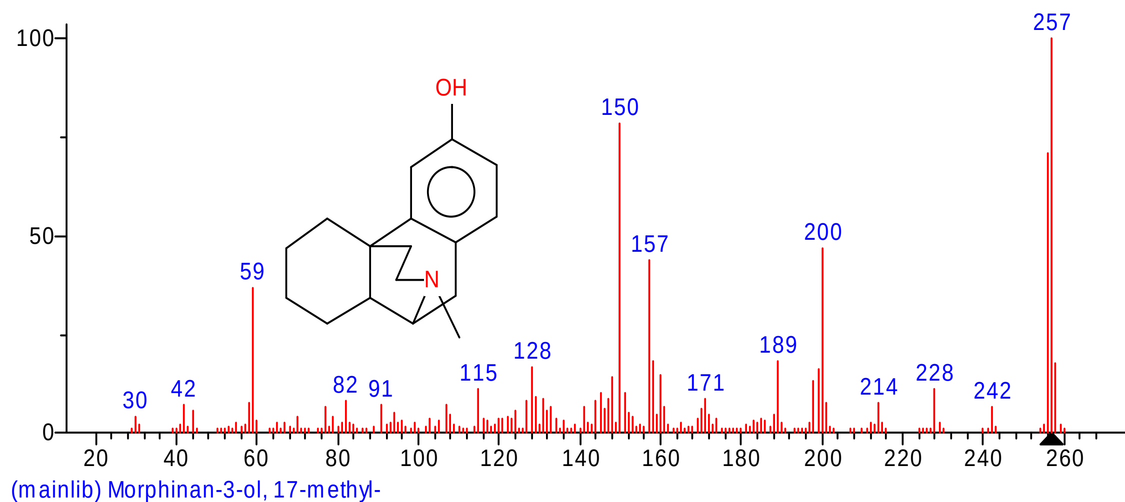


Figura 14. *Spectrul de masa al levorfanolului*

Asa dupa cum se observa de mai sus, si acesti compusi poseda spectre de masa asemanatoare, prezentind asemanari cit deosebiri atit intre ele cit si comparativ cu seria morfinei.

Principalele reactii de fragmentare sunt tot fragmentarile complexe de tip α si β la nivelul grupei functionale aminice tertiare, insotite de transferul unuia sau mai multor protoni si electroni. Astfel, in spectrele de masa ale dextrometorfanului (fragmentarile vor fi exemplificate in cazul dextrometorfanului, pentru levorfanol fiind similare) fragmentele de la m/z= 212 (15%) si m/z= 59 (90%) si respectiv m/z= 214 (37%) si m/z= 57 (3%) sunt explicate tot prin fragmentarile complexe de tip α si β la nivelul grupei functionale aminice tertiare, insotite de transferul a 2 protoni si a mai multor electroni, Fig. 15.

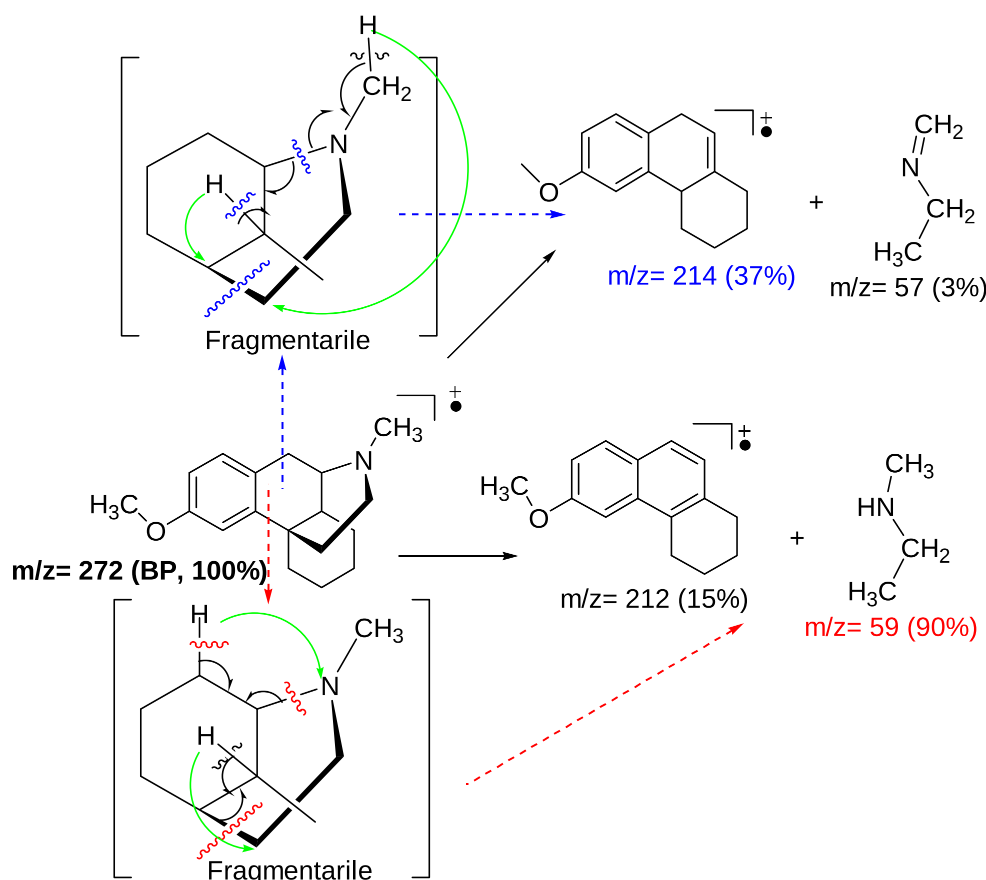


Figura 15. *Fragmentari complexe de tip α si β la nivelul grupei functionale aminice tertiare, insotite de transferul a 2 protoni si a mai multor electroni in cazul dextrometorfanului*

Fragmentele de la m/z= 171 (19%), 150 (51%), 42 (10%) si 31 (11%), sunt explicate printr-o succesiune de reactii de fragmentare: fragmentarile complexe de tip α si β la nivelul grupei functionale aminice (insotite de transferul unora sau mai multor protoni si electroni), Fig. 16.

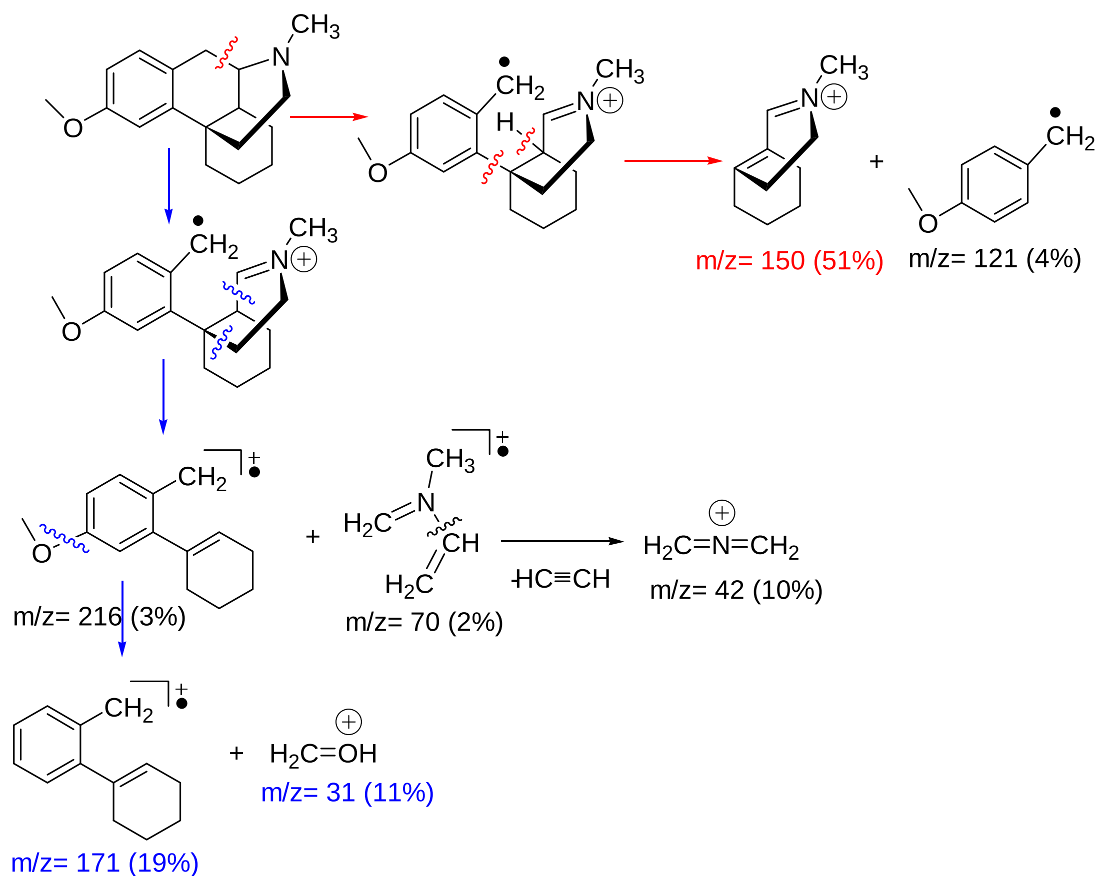


Figura 16. *Fragmentari complexe in cazul dextrometorfanului*

Fragmentul de la m/z= 256 (8%) se datoreste fragmentarii de tip α la nivelul grupei functionale metoxi, Fig. 17.

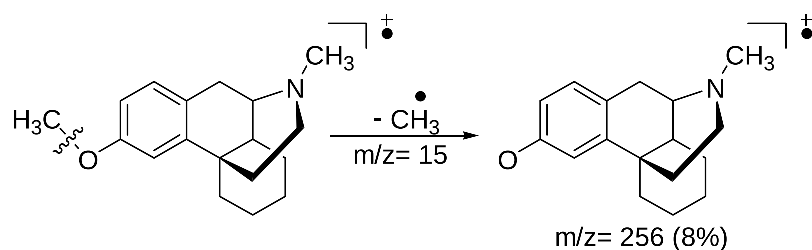


Figura 17. *Schema reactiei de fragmentare α la nivelul grupei functionale metoxi in cazul dextrometorfanului*

Caracteristici comune si deosebiri in spectre

- ionii moleculari sunt fie foarte intensi fie, cel mai adesea, picuri de baza. Ei sunt urmati de picuri intense M+1 (intense) si precedati de M-1 (intense);
- principala reactie de fragmentare este fragmentarea de tip α si β la nivelul grupei functionale aminice tertiare;
- spectrele contin picuri specifice la m/z= 42, 59 (si cele aferente de la M-42, M-59), caracteristice fragmentari de tip α si β la nivelul grupei functionale aminice tertiare;
- spre deosebire de seria morfinei picurile de la m/z= 59 si m/z= 150 sunt foarte intense.

3. Seria benzomorfanului

In aceasta grupa intra analogii triciclici de morfina. Prezentam in continuare spectrele de masa (GC-MS, Electron Impact) ale principalelor droguri din aceasta clasa: *Pentazocina si Fenazocina*.

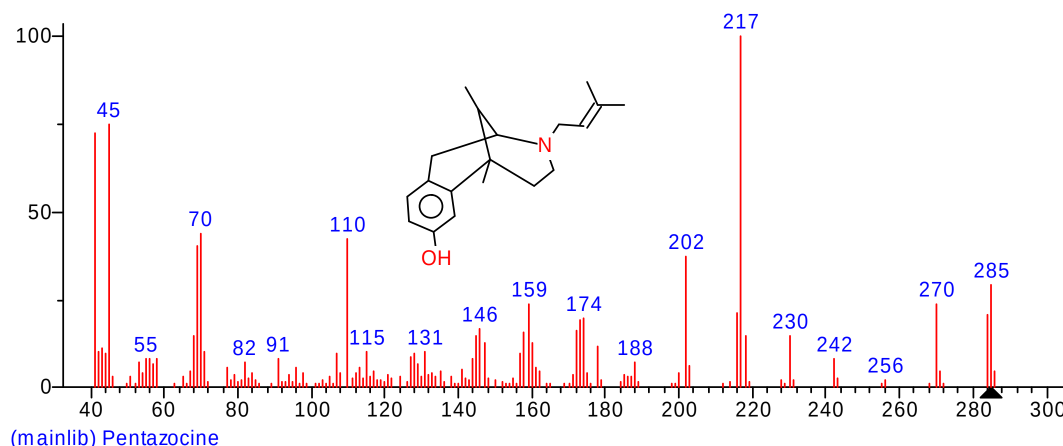


Figura 18. *Spectrul de masa al pentazocinei*

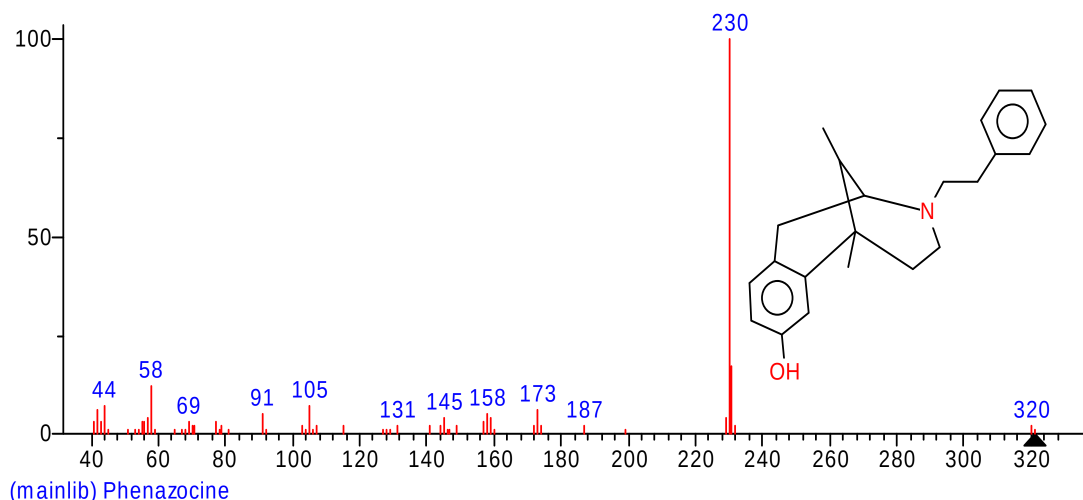


Figura 19. *Spectrul de masa al fenazocinei*

Asa dupa cum se observa de mai sus, acesti compusi poseda spectre de masa mai degraba diferite, prezentind totusi ceva asemanari intre ele si asemanari mult mai putin evidente comparativ cu seria morfinei si morfinanului. Aceste aspecte sunt datorate in primul rind modului diferit de fragmentare: in timp ce in seria morfinei si morfinanului principalele reactii de fragmentare sunt tot fragmentarile complexe de tip α si β la nivelul grupei functionale aminice tertiare, in seria benzomorfanului principalele reactii de fragmentare sunt diferite:

- in cazul pentazocinei principala reactie de fragmentare este o fragmentare de tip ipso la nivelul grupei functionale aminice tertiare insotita de transferul unui proton si de migrarea mai multor electroni, si care justifica fragmentele de la m/z= 217 (BP, 100%) si m/z= 68 (9%), Fig. 20;
- in cazul fenazocinei principala reactie de fragmentare fie o fragmentare de tip α la nivelul grupei functionale aminice tertiare, care corespunde in acest caz cu o fragmentare tropilica, si care justifica fragmentele de la m/z= 230 (BP, 100%) si m/z= 91 (5%), Fig. 21.

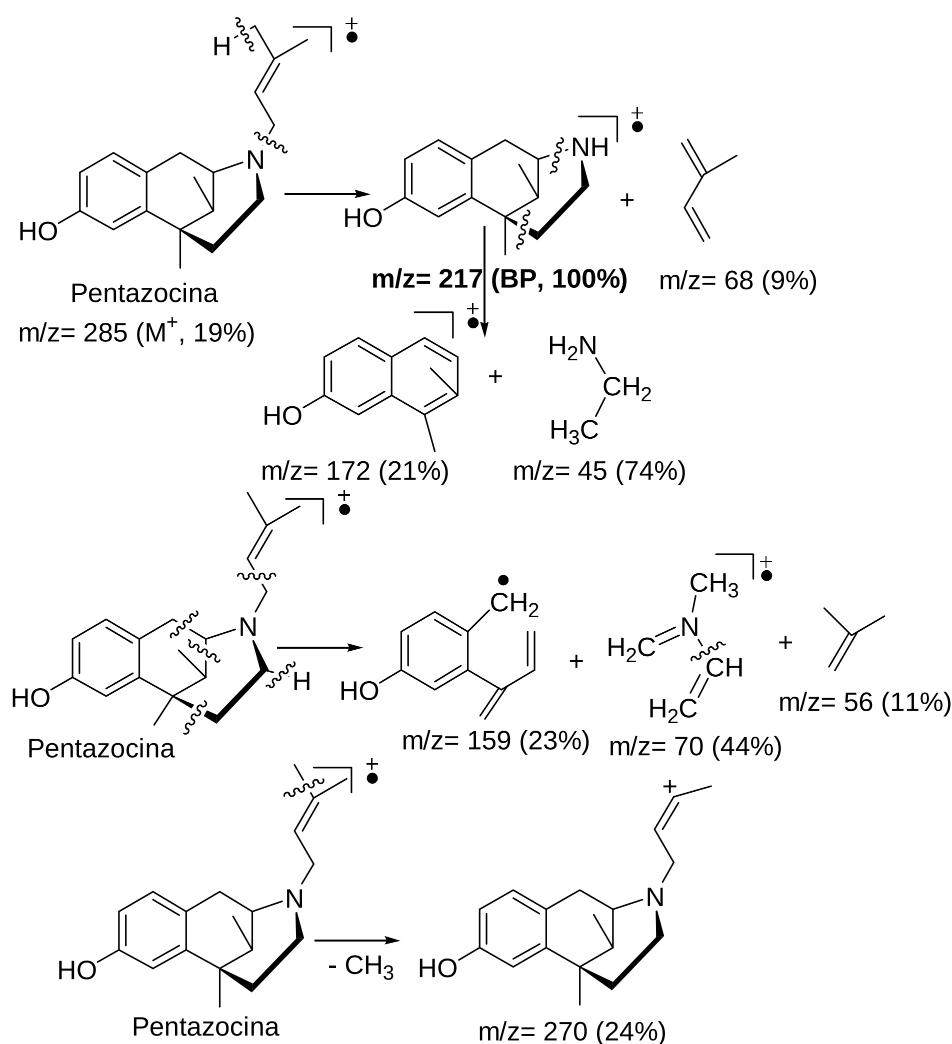


Figura 20. *Schema reactiei de fragmentare in cazul pentazocinei*

Fragmentele de la m/z= 172 (22%), 159 (23%), 70 (44%), 56 (11%) si 45 (74%), sunt explicate printr-o succesiune de reactii de fragmentare: fragmentarile complexe de tip α si β la nivelul grupei functionale aminice (insotite de transferul unora sau mai multor protoni si electroni), Fig. 20. Fragmentul de la m/z= 270 (22%), se explica printr-o fragmentare a metilului din α fata de dubla legatura.

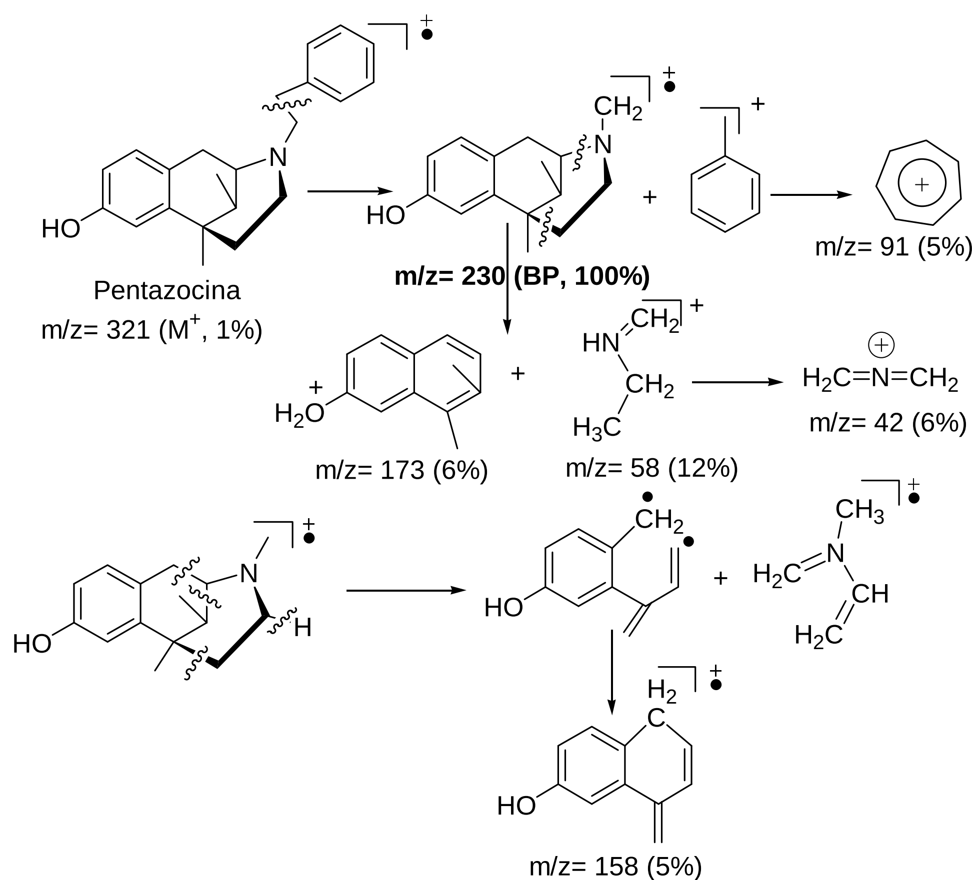


Figura 21. *Schema reactiei de fragmentare in cazul fenazocinei*

Fragmentele de la m/z= 173 (6%), 158 (5%), 58 (12%) si 42 (6%), sunt explicate printr-o succesiune de reactii de fragmentare: fragmentarile complexe de tip α si β la nivelul grupei functionale aminice (insotite de transferul unora sau mai multor protoni si electroni), Fig. 21.

4. Seria piperidinei

In aceasta grupa intra analogii monociclici analogi morfinei. Prezentam in continuare spectrele de masa (GC-MS, Electron Impact) ale principalelor droguri din aceasta clasa: *Petidina (Meperidine, Demerol), α-Prodine, Profadol si Fentanil*.

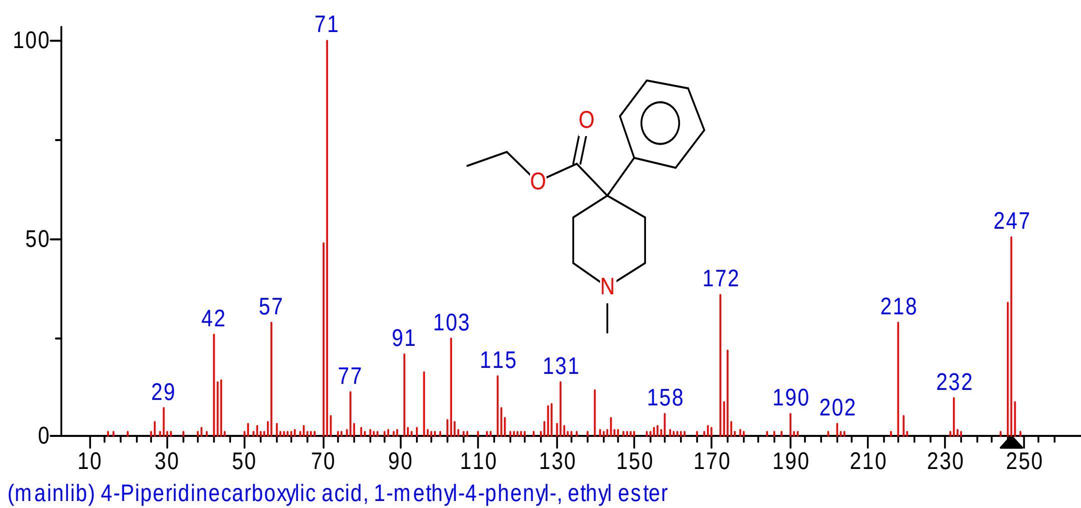


Figura 22. *Spectrul de masa al petidinei*

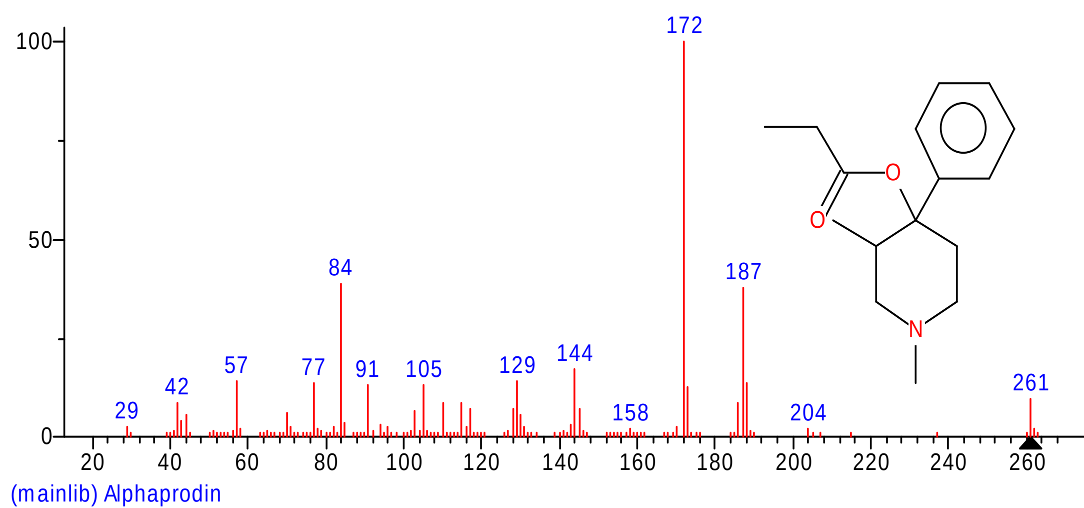


Figura 23. *Spectrul de masa al alfa-prodinei*

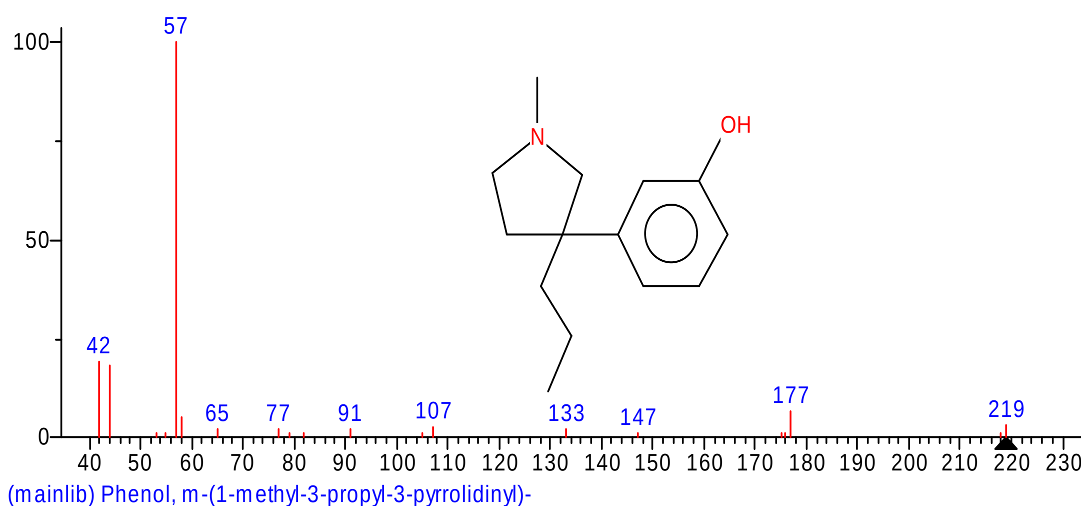


Figura 24. *Spectrul de masa al profadolului*

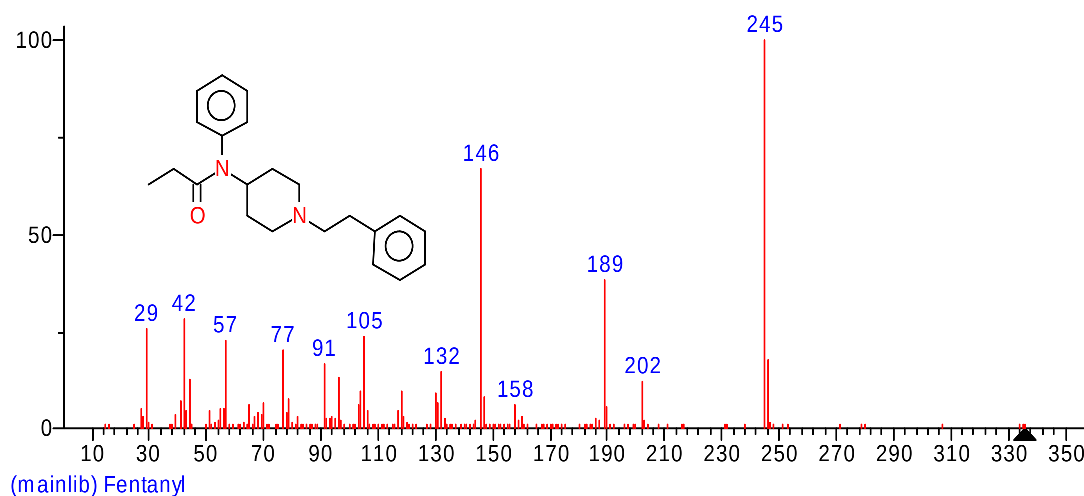


Figura 25. *Spectrul de masa al fentanilului*

Asa dupa cum se observa de mai sus, acesti compusi poseda spectre de masa mai degraba diferite, prezentind totusi ceva asemanari intre ele si asemanari mult mai putin evidente comparativ cu primele 3 serii anterioare de morfinomimetice (care tin de fragmentarile scheletului amini). Din acest motiv fiecare spectru va fi interpretat semarat.

Datele furnizate de spectrul de masa al petidinei permit elaborarea unei scheme a reactiilor de fragmentare ca cea din Fig. 26, si pot fi interpretate dupa cum urmeaza:

- ionul molecular M^+ apare la m/z= 247 cu o intensitate mare, de 50%, caracteristic pentru esteri;

- picul de baza (BP), apare la m/z= 71 (100%) si se datoreaza unei fragmentari α fata gruparea functionala esterica; aceiasi fragmentare explica si picul de la m/z= 174 (19%); fragmentarea ulterioara a ultimului fragment (fragmentarile complexe de tip α si β la nivelul grupei functionale aminice insotite de transferul a 2 protoni si unora sau mai multor electroni) genereaza fragmentele de la m/z= 57 (29%) [din care ulterior se genereaza m/z= 42 (25%)] si m/z= 117 (2%); fragmentul de la m/z= 117 sufera ulterior o fragmentare tropilica generind cationul tropiliu de la m/z= 91 (19%) sau o fragmentare β fata de dubla legatura care genereaza cationul fenil la m/z= 77 (10%); tot prin fragmentarea lui m/z= 117 (fragmentare la nivelul dublei legaturi) se genereaza si fragmentul m/z= 103 (24%);

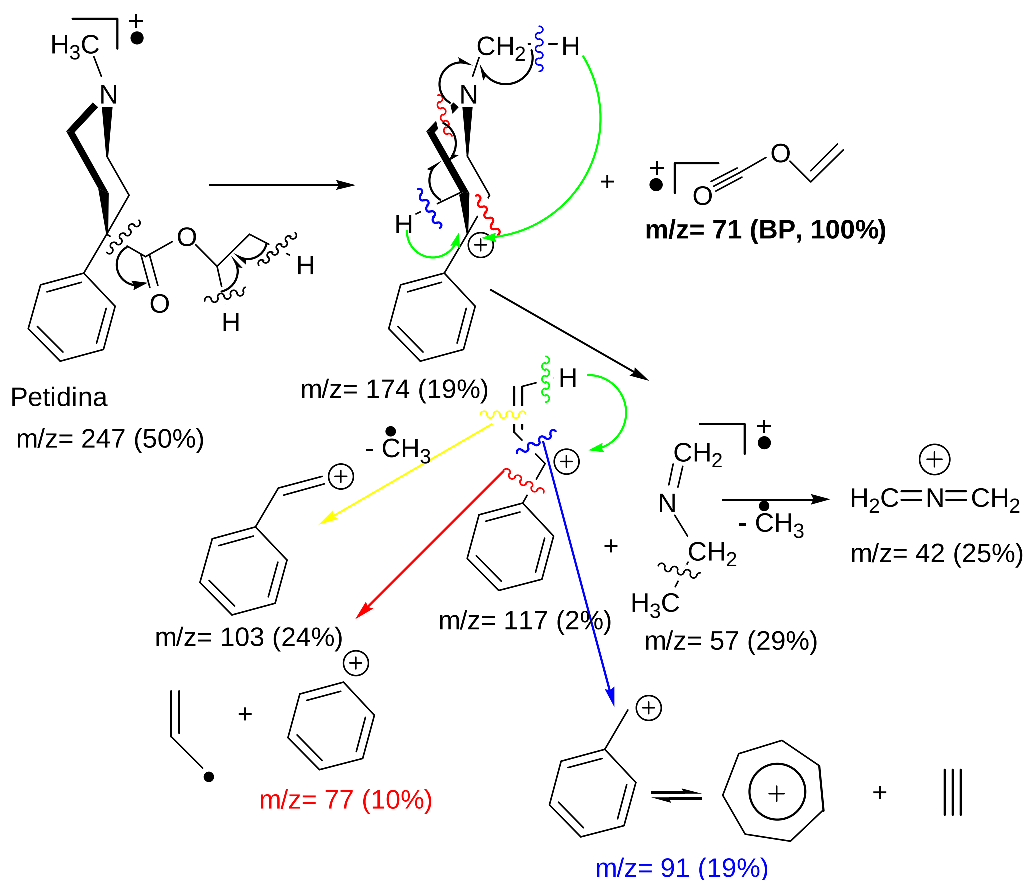


Figura 26. *Schema reactiei de fragmentare pentru petidina*

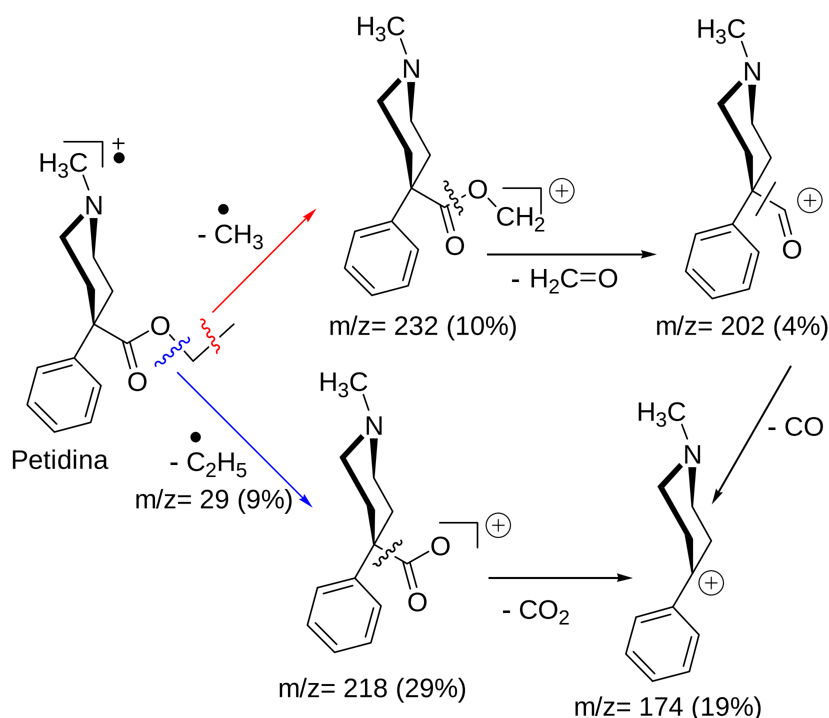


Figura 26. *Schema reactiei de fragmentare pentru petidina (continuare)*

- picul de la m/z= 218 (29%) si cel ulterior de la m/z= 174 (19%) se datoresc unor fragmentari α fata gruparea functionala esterica; fragmentarea metilului (din gruparea etil esterica) genereaza fragmentul de la m/z= 232 (10%) din care ulterior se genereaza m/z= 202 (2%) (tot fragmentari α fata gruparea functionala esterica) iar in final se genereaza m/z= 174 (19%).

Datele furnizate de spectrul de masa al alfa-prodinei permit elaborarea unei scheme a reactiilor de fragmentare ca cea din Fig. 27, si pot fi interpretate dupa cum urmeaza:

- ionul molecular M^+ apare la m/z= 261 cu o intensitate mica, de 11%;

- picul de baza (BP), apare la m/z= 172 (100%) si se datoreaza unor fragmentari complexe in pozitia α fata gruparea functionala esterica insotite de transferul a 2 protoni si unora sau mai multor electroni; fragmentarea ulterioara a ultimului fragment (fragmentarile complexe de tip ipso la nivelul grupei functionale aminice insotite de transferul unora sau mai multor electroni si protoni)

genereaza fragmentul de la m/z= 144 (17%); ulterior, printr-o fragmentare alchilica a gruparii etil, din m/z= 144 se genereaza fragmentul m/z= 117 (2%); fragmentul de la m/z= 117 sufera ulterior o fragmentare tropilica generind cationul tropiliu de la m/z= 91 (13%) sau o fragmentare β fata de dubla legatura care genereaza cationul fenil la m/z= 77 (14%); tot prin fragmentarea lui m/z= 117 (fragmentare la nivelul dublei legaturi) se genereaza si fragmentul m/z= 105 (13%).



Figura 27. *Schema reactiei de fragmentare pentru alfa-prodina*

Datele furnizate de spectrul de masa al profadolului permit elaborarea unei scheme a reactiilor de fragmentare ca cea din Fig. 28, si pot fi interpretate dupa cum urmeaza:

- ionul molecular M^+ apare la m/z= 219 cu o intensitate foarte mica, de 3%, caracteristic pentru fenoli;

- picul de baza (BP), apare la m/z= 57 (100%) si se datoreaza unor fragmentari complexe de tip α si β la nivelul grupei functionale aminice tertiare insotite de transferul unui proton si unora sau mai multor electroni; aceiasi fragmentare explica si picul de la m/z= 162;

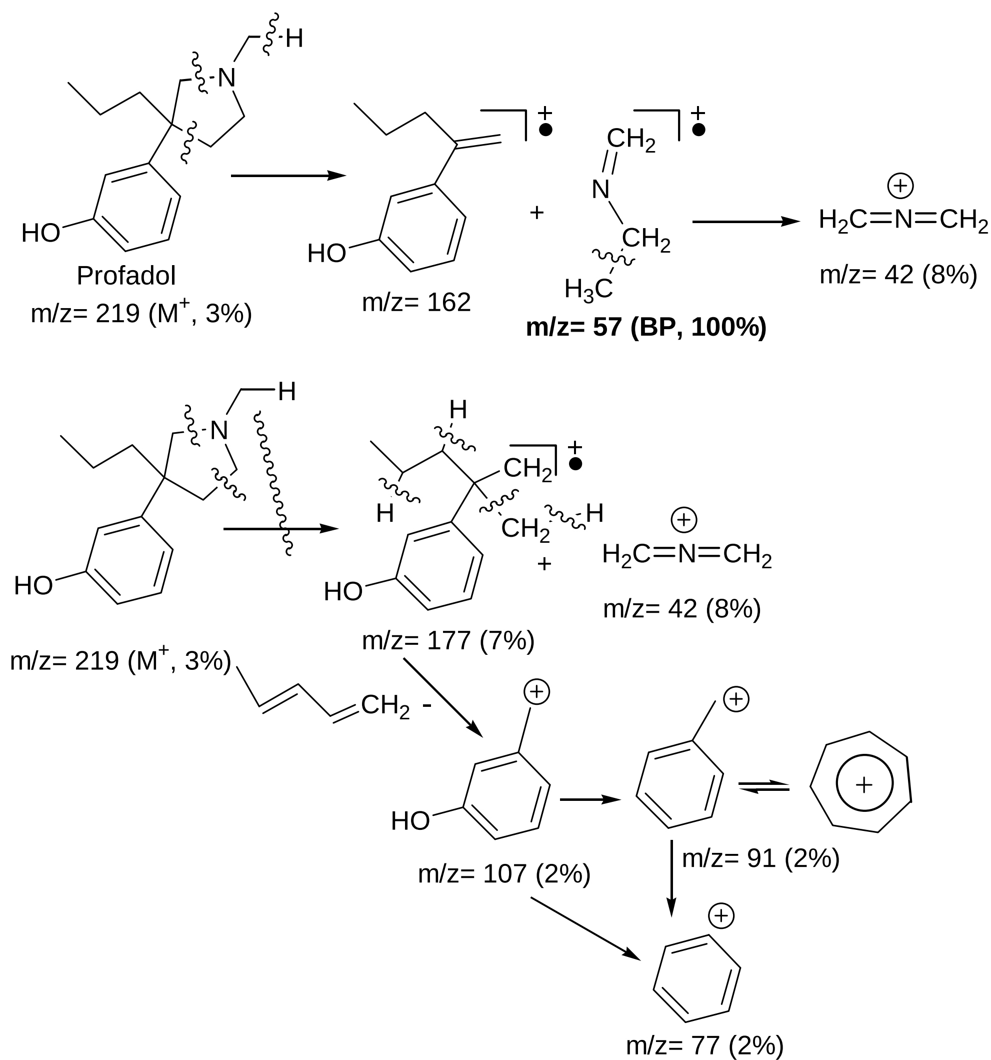


Figura 28. *Schema reactiei de fragmentare pentru profadol*

fragmentarile complexe de tip ipso si α fata de grupa functionala aminica insotite de transferul unora sau mai multor electroni si protoni) genereaza fragmentele de la m/z= 177 (7%) si m/z= 42 (6%); ulterior, printr-o fragmentare complexa a fragmentului de la m/z= 177 se genereaza fragmentul m/z= 107 (2%), din care ulterior printr-o fragmentare tropilica se genereaza cationul tropiliu de la m/z= 91 (2%) si ulterior se genereaza cationul fenil la m/z= 77 (2%).

Datele furnizate de spectrul de masa al fentanilului permit elaborarea unei scheme a reactiilor de fragmentare ca cea din Fig. 29, si pot fi interpretate dupa cum urmeaza:

- ionul molecular M^+ (m/z= 336) lipseste;

- picul de baza (BP), apare la m/z= 245 (100%) si se datoreaza unor fragmentari tropilice (care explica si prezenta cationului tropiliu de la m/z= 91 (17%) si cationul fenil la m/z= 77 (20%);

- fragmentarile complexe de tip α si β la nivelul grupei functionale aminice insotite de transferul a 2 protoni si unora sau mai multor electroni in fragmentul m/z= 245, genereaza fragmentele de la m/z= 189 (38%) si m/z= 57 (23%) [din care ulterior se genereaza m/z= 42 (28%)];

- fragmentarea de tip α la nivelul grupei functionale cetonice insotite migrarea dublei legaturi in fragmentul m/z= 189, genereaza fragmentele de la m/z= 132 (16%) si m/z= 57 (23%) [din care ulterior se genereaza m/z= 29 (26%)];

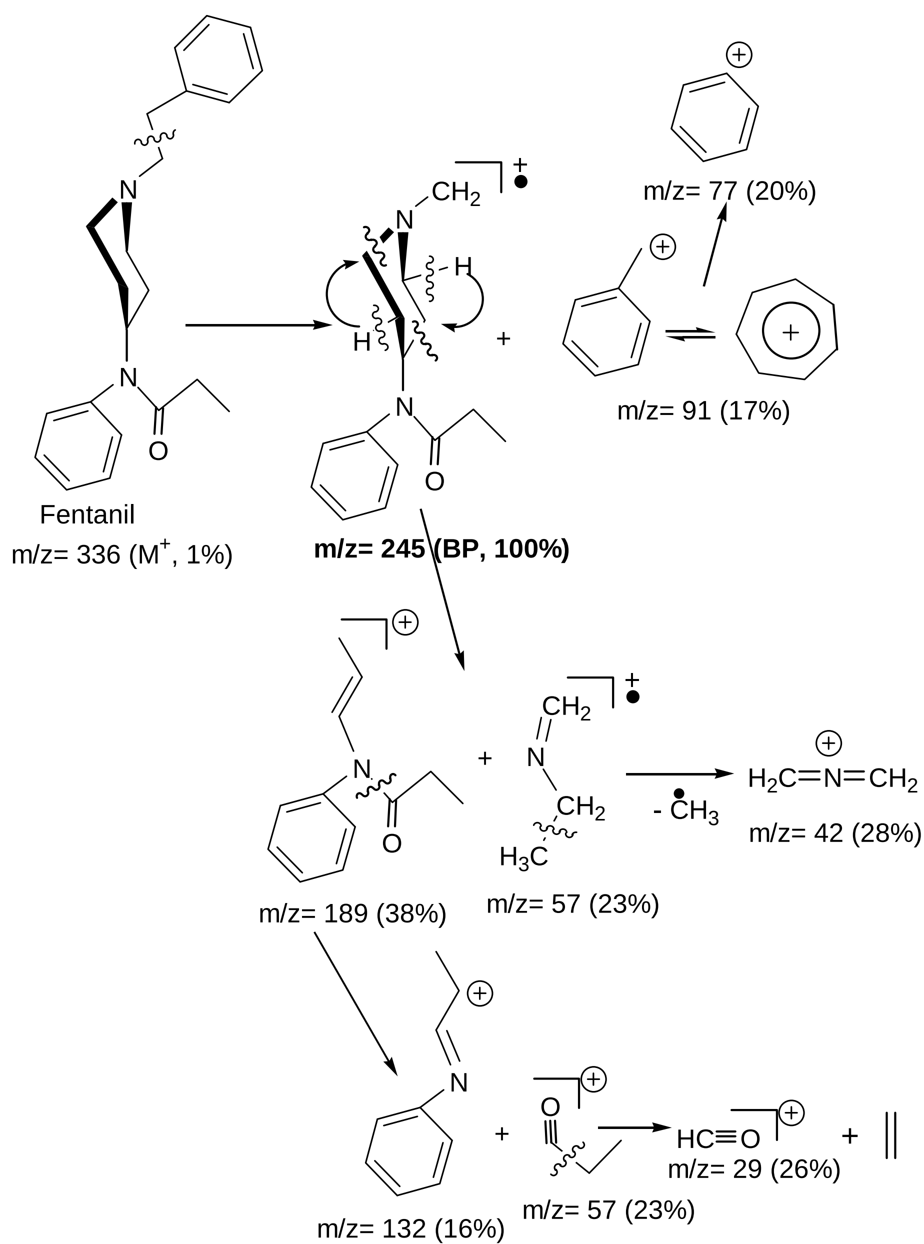


Figura 29. *Schema reactiei de fragmentare pentru fentanil*

BIBLIOGRAFIE

Referinte bibliografice Web

1. UNODC, World Drug Report 2007. Website:
http://www.unodc.org/pdf/research/wdr07/WDR_2007.pdf

2. World Drug Report 2007, United Nations, Office of Drugs and Crime, 2007. Website:
http://www.unodc.org/unodc/index.html

3. Drugs of Abuse, Regional Laboratory for Toxicology. Website:
http://www.toxlab.co.uk/dasguide.htm#OPIATES

4. Drugs of Abuse, Regional Laboratory for Toxicology. Website:
http://www.toxlab.co.uk/dasguide.htm#CANNABIS.

5. Understanding the ''Spice'' phenomenon. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Lisbon, 2009. Website:
http://www.emcdda.europa.eu/html.cfm/index90917EN.html

6. C. Steup, Untersuchung des Handelsproduktes ''Spice''. Note from THC Pharm GmbH. Website:
http://usualredant.de/drogen/download/analyse-thc-pharmspice-jwh-018.pdf

7. Synthetic cannabinoids and ''Spice''. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Lisbon, 2009. Website:
http://www.emcdda.europa.eu/html.cfm/index90414EN.html

Idex alphabetic carti si manuale de referinta

Drummer, O.H. The Forensic Pharmacology of Drugs of Abuse, Oxford University Press, New York, **2001**.

Giddings, J.C.. Unified Separation Science. New York: Wiley, **1991**

Grob, R.L.; Barry, E.F. Modern Practice of Gas Chromatography, Wiley, Hoboken, **2004**

Gross, J.H. Mass Spectrometry - A Textbook, Springer, Heidelberg, **2004**

Harvey, D. Modern Analyiticalt Chemistry, McGraow Hill, London, **2000**

Hübshmann, H.J. Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications, 2nd ed.,Wiley-VCH, Weinheim **2009**

Kitson, F.G.; Larsen, B.S.; McEwan, C.N. Gas Chromatography an Mass Spectrometry – A prasctica Guide, Academic Press, San Diego, **1996**

Liu, R.; Gadzala, D.E. Handbook of Drug Analysis, CRC PRESS, Washinton, DC, **1997**.

Mangalagiu, I. Alcaloizi morfinici si analogy de sinteza, Ed. Dossoftei, Iasi, **2000**.

Maurer, H.H.; Pfleger, K.; Weber, A.A. Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and their Metabolites, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.

McLafferty, F.W.; Turecek, F. Interpretation of Mass Spectra, 4-thy Ed., University Science Books, Sausalito, California, **1993**

Mc Master, M.C. GC/MS: a Practical User,s Guide, Wiley, Hoboken, **2008**

Rood, D. A Practical Guide to the Care, Maintenance, and Troubleshooting fo Capillary Gas Chromatograpy Systems, 2nd Edition, Heidelberg, **1995**

Settle, F, Handbook in Instrumental Techniques for Analytical Chemistry- Section II, Prentice Hall, New Jersey, **1997**

Spiehler, V. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, in: Body Fluids and Postmortem Material, Pharmaceutical Press, London, **2004**.

Yinon, J. Advances in Forensic Applications of Mass Spectrometry, CRC PRESS, New York, **2004**.

Idex alphabetic lucrari stiintifice

Beyer, J.; Peters, F.T.; Maurer, H.H. Ther. Drug Monit. 27 (2005) 151.

Chen, B.H.; Taylor, E.H.; Papas, A.A. J. Anal. Toxicol. 14 (1990) 12.

Felinger, A,; Guiochon, G. Trends in Analytical Chemistry 14 (1995) 6.

Khanna, N., Varshney, I.C., Banerjee, S., Singh, B.B. Analyst 108 (1983) 415.

Lee, M.S.; Kerns, E.H. Mass Spectrom. Rev. 18 (1999) 187.

Maurer, H.H. Anal. Bioanal. Chem. 388 (2007) 1315.
Maurer, H.H.; Tenberken, O.; Kratzsch, C.; Weber, A.A.; Peters, F.T. J. Chromatogr. A 1058 (2004) 169.
Meadway, C.; George, S.; Braithwaite, R. Forensic Science International 127 (2002) 136.
Micaya, A.I., Zaikin, V.G. Mass Spectrom. Rev. 9 (1990) 115.

Nourse, B.D.; Cooks, R.G. Anal. Chem. Acta, 228 (1990) 1.

Ohta, H.; Suzuki, S.; Ogasawara, K. J. Anal. Toxicol. 23 (1999) 280.
O'Neal, C.; Poklis, A. J. Anal. Toxicol. 21 (1997) 427.
Overton, E.B.; Carney, K.R. Trends in Analytical Chemistry 13 (1994) 252.

Staacka, R.F.; Fritschib, G.; Maurera, H.H. Journal of Chromatography B 773 (2002) 35.

Tracqui, A.; Kintz, P.; Mangin, P. J. Forensic Sci. 40 (1995) 254.

Zbancioc, Ghe.; Moldoveanu, C.; Gradinaru, R.; Drochioiu, G.; Olteanu, G.; Mangalagiu I.I. International Journal of Criminal Investigation 1 (2011) 17.
Weinmann, W.; Wiedemann, A.; Eppinger, B.; Renz, M.; Svoboda, M. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 10 (1999) 1028.
